F 1330
09
66

studii şi cercetări de biochimie

1

TOMUL 22

1979

IANUARIE — IUNIE

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 22, nr. 1, p. 1—96, 1979, Bucureşti

SCBIAS—22 (1), (1979)

COMITETUL DE REDACŢIE

Redactor responsabil:

Academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUŞANSCHI

Membri:

EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacţie:

CECILIA MOTAŞ

Revista apare de 2 ori pe an.
Preţul unui abonament anual este de 40 lei.
În ţară abonamentele se fac la oficiile poştale, agenţiile poştale, factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii. Revista se poate procura (direct sau prin poştă) şi prin PUNCTUL DE DESFACERE din cadrul Editurii Academiei.

Cititorii din străinătate se pot abona adresîndu-se la ILEXIM, Departamentul Export-Import Presă, P. O. B. 136 —137 telex 11226, 70116Bucureşti, str. 13 Decembrie nr. 3.

Manualele, cărţile şi revistele pentru schimb, precum şi orice corespondenţă, se vor trimite pe adresa Colegiului de redacţie al revistei „Studii şi cercetări de biochimie" i Bucureşti, P. O. B. 2—2, 78171 Bucureşti 2, România.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
Bucureşti, Calea Victoriei nr. 125, sectorul 1, cod 71021.

1979 MAJ 30

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tomul 22, nr. 1 1979

IANUARIE—IUNIE

SUMAR

LUCIA BUZILĂ, CECILIA MOTAŞ, Dependenţa asamblării moleculei imunoglobulinei. A secretoare (SIgA) din componenta secretoare (SC) şi IgA dimer de prezenţa părţii lor glucidice 3

V. DARIE, M. ŞERBAN, Activitatea unor enzime glicolitice hepatice în diabetul aloxanic 11

IOANA HAGIMA, Peroxidazele şi catalazele seminţelor de grîu în perioada dezvoltării acestora 17

CORINA MIHAIL, CECILIA MOTAŞ, FLORICA MIHALCU, Rolul părţii glucidice în degradarea intracelulară a proteinelor. VII. Proteoliza controlată cu papaină a IgM nativă şi tratată cu un amestec glicozidazic din *Diplococcus pneumoniae* 23

CONSTANŢA MUŞOLAN, S. VASU, IOANA GOMOIU, Influenţa condiţiilor de cultivare asupra activităţii DN-azice în suşe sălbatice şi mutanţi de *Aspergillus niger* 31

G. NEAMŢU, T. LÁSZLÓ, CORINA BILĂUŞ, Contribuţii la biosinteza carotenoidelor. VII. Biosinteza carotenoidelor din *Aesculus parviflora Walt* . . 39

R. OLINESCU, GH. CIOBA, T. SAFTA, STELA NIŢĂ, Modificări ale sistemelor producătoare de energie în stări de şoc 47

V. I. POP, D. PORUŢIU, GH. BENGA, Dozarea fosfatului din fosfolipidele separate prin cromatografie în strat subţire pe silicagel 55

H. D. SCHELL, DANIELA BĂNĂŢEANU, T. BENŢIA, Obţinerea şi caracterizarea unor preparate enzimatice imobilizate, cu aplicaţii în industria laptelui 59

MARGARETA ŞERBAN, CEZARINA CUCU, C. VLĂDESCU, Purificarea ureazei din soia în scopul utilizării ei ca reactiv pentru determinarea ureei . . 67

RECENZII 71

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
B I O C H I M I E

Tome 22, nº. 1 — 1979
JANUARY — JUNE

CONTENTS

LUCIA BUZILĂ, CECILIA MOTAŞ, The assembly of the secretory component (SC) and dimer IgA into secretory immunoglobulin A (SIgA), as a function of the presence of their carbohydrate moiety . . . 3

V. DARIE, M. ŞERBAN, L'activité des quelques enzymes glycolitiques hépatiques dans le diabète alloxanique . . . 11

IOANA HAGIMA, Peroxidases and catalases in wheat seeds during their growth period . . . 17

CORINA MIHAIL, CECILIA MOTAŞ, FLORICA MIHALCU, The role of carbohydrate moiety in the intracellular degradation of glycoproteins. VII. Papain controlled proteolysis of IgM native and treated with a glycosidases mixture from *Diplococcus pneumoniae* . . . 23

CONSTANŢA MUŞOLAN, S. VASU, IOANA GOMOIU, The influence of cultivation conditions on the DN-ase activity in wild strains and mutants of *Aspergillus niger* . . . 31

G. NEAMŢU, T. LÁSZLÓ, CORINA BILĂUŞ, Contributions to the study of the biosynthesis of carotenoids. VII. Biosynthesis of carotenoids from *Aesculus parviflora* Walt . . . 39

R. OLINESCU, GH. CIOBA, T. SAFTA, STELA NIŢĂ, Modifications of the energy-producing systems in the shock states . . . 41

V. I. POP, D. PORUŢIU, GH. BENGA, The determination of phosphate from phospholipids separated by thin-layer chromatography on silicagel . . . 55

H. D. SCHELL, DANIELA BĂNĂŢEANU, T. BENŢIA, The preparation and characterization of some immobilized enzymes used in dairy industry 59

MARGARETA ŞERBAN, CEZARINA CUCU, C. VLĂDESCU, La purification de l'uréase, en vue de son utilization comme réactif pour la détermination de l'urée . . . 67

REVIEWS . . . 71

DEPENDENŢA ASAMBLĂRII MOLECULEI IMUNOGLOBULINEI A SECRETOARE (SIgA) DIN COMPONENTA SECRETOARE (SC) ŞI IgA DIMER DE PREZENŢA PĂRŢII LOR GLUCIDICE

LUCIA BUZILĂ, CECILIA MOTAŞ

Rezumat. Efectul endoglicozidazelor din *Diplococcus pneumoniae* asupra asamblării moleculei IgA secretoare din IgA dimer şi SC a fost urmărit prin deglucidizarea celor două componente şi apoi urmărirea schimbărilor survenite asupra complexului format. Modificările respective au fost urmărite în raport cu martorul (complex în care cele două componente nu au fost supuse deglucidizării) evidenţierea lor realizîndu-se prin imunoelectroforeză în agar, imunodifuzie şi electroforeza în disc de poliacrilamidă. Rezultatele obţinute arată că îndepărtarea lanţurilor glucidice de pe suprafaţa moleculelor nu favorizează şi nici nu împiedică formarea complexului respectiv.

În cele mai multe secreţii exocrine, imunoglobulina predominantă este imunoglobulina A dimer foarte stabilă. În timpul trecerii ei prin celulele glandulare, dimerul se conjugă cu componenta secretoare, o glicoproteină epitelială (1). Imunogobulina M (IgM) este de asemenea transmisă selectiv prin epiteliul glandular (2). S-a presupus că SC ar putea să acţioneze ca un receptor specific epitelial pentru imunoglobuline şi deci să determine transferul selectiv a IgA dimer şi a IgM 19S (3) (4).

Mach a demonstrat iniţial că se formează complexe spontane cînd IgA dimer este amestecat cu SC liberă (5). Tot el a menţionat că şi IgM este capabilă să se cupleze cu SC. Independent, Radl şi colab. (6) au obţinut aceleaşi complexe, însă, de preferinţă cu polimeri foarte mari de IgM (25=30S). Ulterior, şi alţi autori s-au ocupat de complexele formate, in vitro, IgA-SC (7) (8).

Odată cu apariţia lanţului J (9) s-a ridicat chestiunea rolului jucat de acesta şi de componenta secretoare în stabilizarea moleculelor de SIgA. Un interes special îl ridică clarificarea relaţiei între prezenţa lanţului J şi prinderea SC de molecula IgA dimer, deoarece toate imunoglobulinele polimer care prind SC, conţin lanţ J.

În adevăr, s-a demonstrat că afinitatea SC pentru imunoglobulinele polimere este dependentă de prezenţa lanţurilor J în aceste imunoglobuline (10) (11).

Cum toate trei componentele complexului sînt glicoproteine, ne-am propus să determinăm rolul părţii glucidice în asamblarea moleculei, prin compararea comportării la complexare a celor două componente tratate cu un amestec glicozidazic. Am ales pentru tratarea cu glicozidaze IgA dimer şi SC, în urma rezultatelor anterioare care indică o acţiune puternică a glicozidazelor asupra IgA dimer şi o modificare foarte redusă a componentei secretoare (12).

MATERIAL ŞI METODE

Izolarea şi purificarea componentei secretoare s-a făcut din colostru uman obţinut de la maternitatea clinică de ginecologie a spitalului Caritas, Bucureşti, de la femei la 2—3 zile post-partum. Colostrul a fost decazeinificat prin acidifiere la pH 4,2 cu acid acetic 2% după care s-a centrifugat 30 min la 32 000 g la 4°C. După centrifugare pentru izolarea şi purificarea componentei secretoare din colostrul decazeinificat s-a folosit metoda lui Newcomb (13) modificată de J. Mestecky (14).

Obţinerea amestecului glicozidazic. În vederea obţinerii unui amestec glicozidazic format din β-galactozidază, exo şi endo-β N-acetilglucozaminidază şi neuraminidază, s-a lucrat cu o tulpină liofilizată (53 148/Pasteur) de *Diplococcus pneumoniae* tip I crescută la Institutul Cantacuzino după metoda lui Muramatsu (15). Purificarea ei s-a făcut după Koide şi Muramatsu (16).

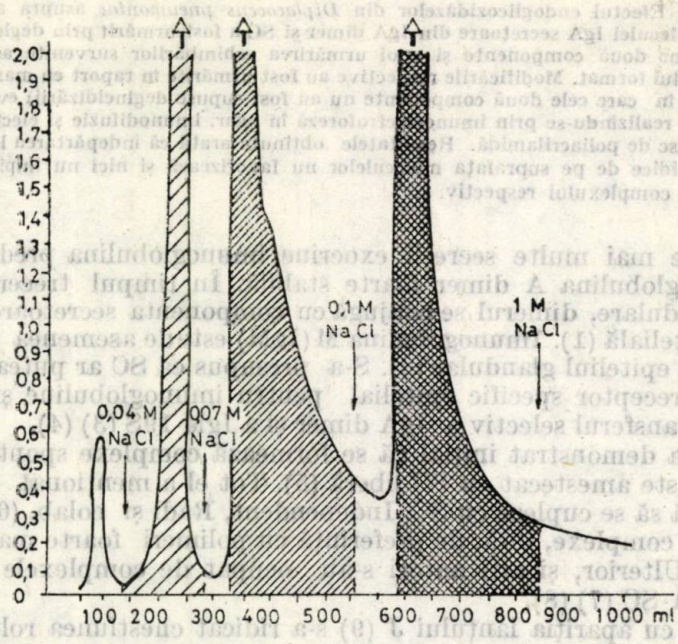


Fig. 1 — Cromatografia pe DEAE celuloză în gradient de NaCl a precipitatului de sulfat de amoniu 50%.

Izolarea şi purificarea IgA seric dimer s-a făcut din ser uman obţinut de la bolnavi cu mielom de tip IgA. Serul respectiv a fost prelucrat după metoda lui Brandtzaeg (17). Pentru îndepărtarea fibrinogenului, albuminelor şi lipoproteinelor, plasma a fost recalcificată şi precipitată cu dextran sulfat 10%.

100 ml plasmă a fost tratată cu 4 ml sodium dextran sulfat 10% + 10 ml $CaCl_2$ şi a fost centrifugată 1/2 oră la 4°C, 30 000 rpm. Serul astfel obţinut a fost în continuare diluat 1 : 2 cu tampon fosfat 0,01 M pH 7,5 + 0,15 M NaCl şi precipitat cu sulfat de amoniu în proporţie de 50%. Precipitatul format a fost reluat în tampon fosfat 0,01 M pH 7,6 pînă la o completă dizolvare şi apoi dializat faţă de tampon fosfat 0,01 M pH 7,6 timp de 3 zile.

Soluţia proteică a fost trecută pe o coloană cromatografică cu DEAE celuloză echilibrată în tampon fosfat 0,01 M pH 7,6. Coloana a avut dimensiunile de 21/2,5 cm. Cantitatea de proteină introdusă în coloană la fiecare trecere a fost de 750 mg.

Eluţia s-a făcut discontinuu cu gradient de concentraţie, iar viteza de eluţie a fost de 70 ml/oră. Gradientul de concentraţie folosit a fost clorura de sodiu în tamponul fosfat de bază de mai sus. Concentraţiile respective de NaCl aplicate au fost : 0,04 M, 0,07 M, 0,1 M şi 1 M. Probele colectate au fost de 5 ml.

Curba de eluţie este trasată în figura 1.

Fracţiunea de IgA eluată cu 0,04 M NaCl reprezintă IgA monomer sau fracţiunea 7S, cea eluată la 0,07 M NaCl reprezintă IgA dimer sau fracţiunea A iar de la 0,1 M reprezintă IgA polimer sau fracţiunea B.

Fracţiunile conţinînd piscul eluat la concentraţia de 0,07 M NaCl a fost purificat în continuare prin reprecipitare în proporţie de 50 % cu sulfat de amoniu. Precipitatul a fost ţinut timp de 24 ore la 4°C. După centrifugare la 30 000 rpm timp de 30 min precipitatul dizolvat s-a dializat faţă de tampon TRIS-HCl 0,05 M pH 8 cu NaCl 0,2 M şi EDTA 0,002 M şi apoi s-a cromatografiat pe Sepharoză 6B echilibrată cu tamponul de dializă. Coloana respectivă a avut dimensiunile 84/2,5 cm şi a fost încărcată cu 86 mg proteină. Viteza de curgere a fost de 25 ml/oră, fiecare probă conţinînd 2 ml.

Curba de eluţie pe Sepharoză 6B este dată în figura 2.

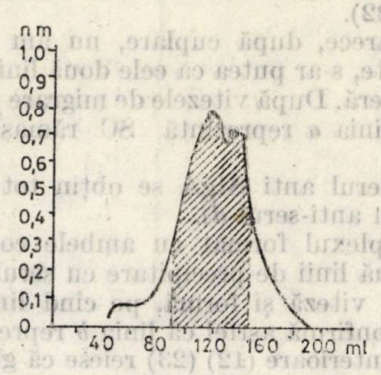


Fig. 2. — Cromatografia pe Sepharoză 6B a piscului eluat cu 0,07 M NaCl din figura 1.

Piscul respectiv a fost dializat 48 ore faţă de apă distilată, concentrat şi apoi liofilizat. Produsul liofilizat a fost încercat ca puritate şi fiind pur l-am folosit în toate experienţele noastre.

Cuplarea IgA dimer cu componenta secretoare s-a făcut după B. Lindh şi J. Bjork (8). Componenta secretoare a fost prezentată într-un exces molar de 1,5/1, cu o concentraţie proteică totală de 5—8 mg/ml. Pentru calcularea raporturilor molare s-au întrebuinţat greutăţile moleculare de 335 000 pentru IgA dimer şi 75 000 pentru SC.

Concentraţiile folosite de noi dependent de molaritatea componentelor au fost 2,97 mg IgA dimer + 1,03 mg componentă secretoare + 0,55 ml tampon fosfat 0,02 M pH 7 + 0,1 M NaCl. Amestecul a fost ţinut 2 ore la 37°C şi apoi pînă a doua zi la 4°C la frigider.

Tratamentul cu glicozidaze s-a făcut utilizîndu-se raportul de 1/5 între glicozidaze şi substratul proteic (IgA dimer sau SC). Amestecul a fost ţinut timp de 5 zile la 37°C. După deglucidizare s-a realizat cuplarea respectîndu-se condiţiile de mai sus.

Imunoelectroforeza s-a făcut în gel de agar 1,5 % în tampon veronal-veronal sodic cu o putere ionică de 0,05 μ şi un pH 8,6 după metoda lui Radl (18). Stratul a fost tăiat spre polul +, iar migrarea s-a făcut tot spre polul +. Timpul de migrare a fost de 2 1/2 ore iar intensitatea de 1 mA/cm placă şi 200 V.

Prepararea serurilor imune s-a făcut pe iepuri. Administrarea antigenului a avut loc în două reprize a cîte 10 injecţii intradermice. La o repriză s-au injectat 2 mg componentă secretoare în 0,5 ml ser fiziologic cu 0,5 ml adjuvant Freund complet Calbiochem. Intervalul între cele două reprize a fost de două săptămîni. La 10 zile după ultima injecţie, animalele s-au sîngerat din ureche pentru proba existenţei anticorpilor şi apoi s-au sîngerat la alb.

Dubla difuzie s-a făcut în gel de agaroză 1 % în ser fiziologic după metoda Ouchterlony (19).

Electroforeza în disc de poliacrilamidă a fost făcută după Davis (20). După electroforeză discurile au fost colorate folosind metodele uzuale.

REZULTATE

Formarea complexelor s-a determinat pe două tipuri de probe:

1. IgA dimer cuplată cu SC.
2. IgA dimer şi SC tratate cu glicozidaze şi apoi cuplate.

Modul de asamblare s-a urmărit prin metode imunologice și fizico-chimice.

Caracterizarea imunologică a complexelor.

a) *Prin imunoelectroforeză* (fig. 3). Se constată că noi nu obținem modul de comportare dat de Radl și colab. (6). Obținem două linii de precipitare cu serul anti SC (fig. 3.; 1 sau 2), care ar putea fi date de prezența a două populații de SIgA, una cu determinantul I ascuns și una cu acest determinant expus (8) (21). Populația cu determinantul expus reprezintă complexe relativ slabe, stabilizate numai prin legături necovalente (22).

Deoarece, după cuplare, nu am separat complexul de excesul de componente, s-ar putea ca cele două linii să reprezinte SIgA formată și SC rămasă liberă. După vitezele de migrare prezentate în lucrarea lui Radl (6), reiese că linia *a* reprezintă SC rămasă necuplată și linia *b*, complexul format.

Cu serul anti SIgA se obțin tot două linii de precipitare (fig. 3, proba 2 cu anti-serul *d*).

Complexul format cu ambele componente tratate cu glicozidaze, dă tot două linii de precipitare cu serul anti SC, din care linia *a* rămîne cu aceeași viteză și formă, pe cînd linia *b* își modifică viteza catodică.

Se confirmă astfel că linia *b* reprezintă complexul format, deoarece din date anterioare (12) (23) reiese că glicozidazele din *Diplococcus pneumoniae* nu acționează asupra SC, ci numai asupra IgA dimer. Modificarea vitezei de migrare spre anod, denotă însă, după Radl și colab. (6), neformarea complexului (Fig. 3.3).

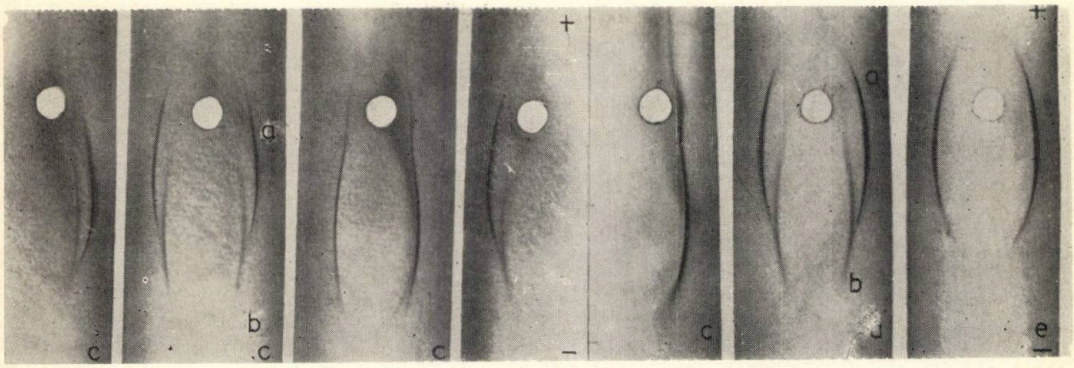
Dubla difuzie (fig. 4) (fig. 5).

În scopul elucidării alternativelor care reies de la imunoelectroforeză, s-a efectuat dubla difuzie atît față de serul anti SC (fig. 4) cît și față de serul anti SIgA (fig. 5).

Cu serul anti SC, complexul formează două linii de precipitare, ambele fuzionînd cu linia formată de SC, asemănător rezultatelor lui Lindh (8), interpretate de acesta ca reprezentînd două populații de SIgA, cu I determinant liber și ascuns (22). Din experiențele lui Lindh (8) reiese că și proba de SIgA din colostru, întrebuințată ca martor, dă tot două linii de precipitare, pe cînd în cazul nostru, SIgA nu prezintă decît o singură linie, corespunzătoare liniei mai apropiate de godeul antigenului și prezentînd identitate totală cu linia SC liberă.

Proba cu componente tratate prezintă tot două linii de precipitare, numai că în cazul acesta linia dinspre antiser este foarte difuză, dă identitate parțială cu linia SIgA, fiind cu determinanți antigenici mai puțini. Se pare că aceasta este linia complexului, din aceleași considerente, că glicozidazele din *Diplococcus pneumoniae* nu eliberează glucide decît din IgA dimer.

Figura 5 prezintă rezultatele imunodifuziei față de serul anti-SIgA. Și în acest caz proba noastră de complex dă tot două linii de precipitare, ceea ce nu obține Lindh (8), ambele fuzionînd însă cu linia dată de SIgA colostral care este parțial identică cu IgA dimer, o reflectare a prezenței componentei secretoare în SIgA. Linia dată de IgA dimer prezintă o identitate totală cu linia cu difuzie mai rapidă a complexului, pe cînd linia mai lentă este total separată. Componenta secretoare și complexul ei



3 2 5 1 5 2 4

Fig. 3. — Imunoelectroforeza probelor.

1 — complex obişnuit; *2* — complex obişnuit; *3* — complex obţinut cu componentele respective deglucidizate; *4* — IgA dimer; *5* — Componenta secretoare.

În şanţuri s-a aplicat ser anti componentă secretoare *(c* şi ser anti IgA secretor*(d)*, ser anti IgA seric*(e)* .*a* = linia corespunzătoare componentei secretoare rămasă liberă; *b* = linia corespunzătoare complexului format

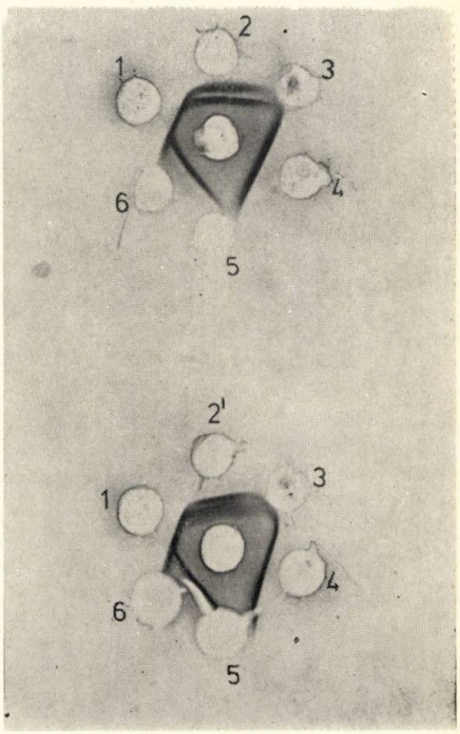


Fig. 4. — Reacţia Ouchterlony faţă de ser anti-componentă secretoare.

1 = componenta secretoare; *2* = proba cuplare martor; *2'* = proba cuplare deglucidizată; *3* = Imunoglobulina A secretoare; *4* = componenta secretoare; *5* = 0; *6* = Imunoglobulina A dimeră.

În godeul din mijloc ser anti componentă secretoare.

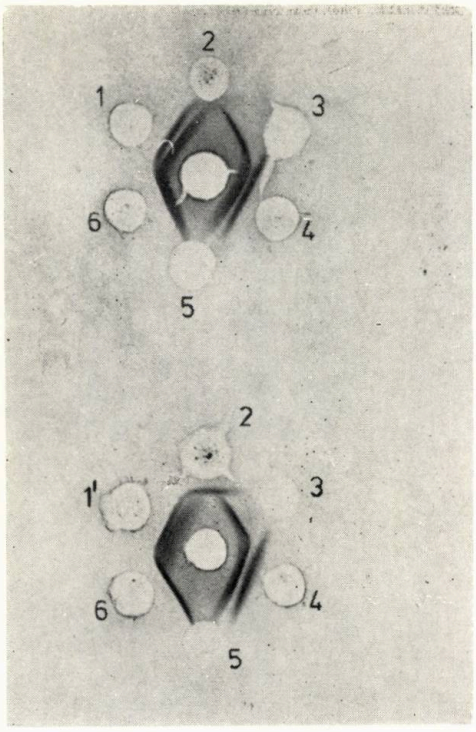


Fig. 5. — Reacţia Ouchterlony faţă de serul anti imunoglobulina A secretoare.

1 = proba cuplare martor; *1'* = proba cuplare deglucidizată; *2* = Imunoglobulina A secretoare; *3* = Imunoglobulina A dimer; *4* = proba cuplare martor; *4'* = proba cuplare deglucidizată; *5* = *0*; *6* = componenta secretoare.

Ser anti imunoglobulina A secretoare în godeul din mijloc.

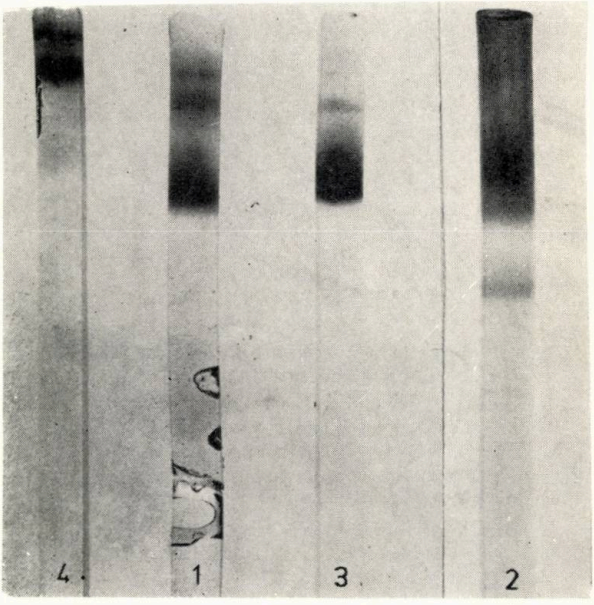


Fig. 6. — Electroforeza în disc de poliacrilamidă

1 = complex obişnuit; *2* = complex deglucidizat; *3* = IgA dimer; *4* = componenta secretoare.

cu IgA dimer ar fi trebuit să prezinte o identitate parţială, deoarece SC reacţionează numai cu anticorpii formaţi contra SC din SIgA, însă complexul dintre IgA şi SC reacţionează de asemenea cu anticorpii contra IgA din moleculă. Lipsa acestui pinten, la ambele probe, în prezenţa sau absenţa glicozidazelor, este un indiciu sigur că IgA dimer folosit de noi nu poate da complexe decît în foarte mică măsură. Aceste complexe, fiind în cantitate mică, nu reuşesc să prezinte linia de precipitare caracteristică SIgA faţă de linia SC.

Reconsiderînd acum rezultatele expuse în figurile 3 şi 4, constatăm că nici unele din ele nu exprimă clar formarea complexelor de SIgA, nefiind asemănătoare nici rezultatelor lui Radl şi colab. (6), nici celor obţinute de Lindh (8). Scindarea unei părţi glucidice din molecula IgA dimer nu contribuie la o rearanjare a moleculei pentru a uşura formarea complexului.

Disc electroforeza la pH alcalin, prezentată în figura 6, confirmă concluziile desprinse din rezultatele obţinute la dubla difuzie cu serul anti SIgA.

Se constată că migrarea complexului prezintă cele două componente în mod distinct şi nu SIgA (fig. 6.1). Proba tratată cu glicozidaze prezintă o imagine difuză care ar putea să conducă la ideea formării, spre start, a SIgA.

Rezultatele de la dubla difuzie nu confirmă însă această supoziţie; scindarea unei părţi glucidice modifică viteza de migrare a IgA dimer, în sensul unei încetiniri a migrării.

DISCUŢII

IgA dimer întrebuinţată a fost obţinută dintr-un mielom, prin separarea de forme polimere şi monomere ale aceluiaşi ser.

Nu putem explica de ce IgA dimer folosit de noi nu s-a putut complexa cu o cantitate maximă de SC. Probabil unele molecule au suferit prin prelucrare o schimbare în structură incompatibilă cu fixarea SC, de exemplu o denaturare sau o blocare a unei grupări funcţionale. Blocarea poate include prinderea nespecifică a unei proteine necunoscute. În acest sens, este de menţionat că SC se prinde de IgA nu numai prin legături necovalente ci şi prin legături covalente, datorită prezenţei unei punţi disulfidice labile în structura SC (24). Se formează două legături interlanţuri cu gruparea —SH relativ inaccesibilă a IgA (25) printr-o reacţie de interschimb. Nu se ştie dacă una sau ambele subunităţi ale IgA dimer sînt implicate în această reacţie, dar se pare că nu sînt implicate legături disulfidice între SC şi lanţul J (7) (26).

Posibilitatea blocării grupărilor —SS— ale IgA este mărită de capacitatea de a se asocia cu proteine serice de tipul α_1 tripsin inhibitor sau albumină (27) (11).

O altă posibilitate de necomplexare ar fi faptul că unele molecule dimer ar fi lipsite de lanţ J, a cărui prezenţă este necesară pentru interacţie cu componenta secretoare (10) (11).

Faptul că IgA dimer folosit de noi nu a dat complexe cu SC, a fost un prilej de a-l întrebuinţa în încercarea de determinare a eventualului rol jucat de partea glucidică în complexele formate. Aceasta cu atît mai mult

cu cît este rezonabil să se presupună că prinderea SC cere pe lîngă prezența lanțului J și o juxtapunere spațială specifică a celor două componente monomere ale IgA. Oricare ar fi aranjarea structurală a SIgA, fiind o moleculă hidrofilă, partea glucidică a unor componente trebuie să fie îndreptată spre suprafața moleculei. Pe de altă parte la IgA se știe că partea glucidică este prinsă pe fragmentul Fc, adiacent grupărilor —SS— implicate în prinderea SC și a lanțului J (28).

În acest context, era firesc, avînd la îndemînă un instrument de deglucidizare parțială blîndă a glicoproteinelor, cum sînt glicozidazele, mai ales enzimele endoglicozidazice, să încercăm să determinăm rolul părții glucidice.

Rezultatele noastre au indicat însă, că lanțurile glucidice pe care le-am îndepărtat noi de pe suprafața moleculelor de IgA dimer nu au contribuit la împiedicarea formării complexelor de SIgA.

Nu este exclus însă, ca partea glucidică să contribuie la antigenicitatea moleculelor glicoproteice, determinînd conformația unor determinanți antigenici. Lucrarea recentă a lui Iscaki (29) care evidențiază noi determinanți antigenici pe molecula de SC, ar putea fi explicată în acest fel.

CONCLUZII

În lucrarea de față IgA dimer utilizat de noi se complexează în foarte mică măsură cu componenta secretoare pentru formarea IgA secretor.

Lanțurile glucidice îndepărtate de noi de pe suprafața moleculelor de IgA dimer și SC produc o serie de modificări. Modificările respective nu au contribuit la o rearanjare a moleculelor pentru a favoriza formarea complexelor de SIgA.

Prezentat la redacție
la 11 decembrie 1978

Institutul de Științe Biologice
Departamentul de Biochimie
Colectivul de Proteine
București, Splaiul Independenței 296

THE ASSEMBLY OF THE SECRETORY COMPONENT (SC) AND DIMER IgA INTO SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A (SIgA), AS A FUNCTION OF THE PRESENCE OF THEIR CARBOHYDRATE MOIETY

SUMMARY

Dimer IgA and SC were treated with *Diplococcus pneumoniae endoglycosidases*, and the effects of the removal of carbohydrates from their molecules on the complex assembly were followed. The alterations were estimated in relation with control experiments, where the two components were not subjected to endoglycosidases attack; agar immunoelectrophoresis, immunodiffusion, and polyacrylamide disc electrophoresis tests were performed. The results show that the removal of the carbohydrates chains at the surface of the molecules neither stimulates, nor hinders th e complex assembly.

BIBLIOGRAFIE

1. T. B. Tomasi, T. B. Solomon, R. A. Prendergast, J. exp. Med., **121**, 101 (1965).
2. P. Brandtzaeg, Clin. Exp. Immunol., **8**, 69 (1971).
3. M. A. South, M. D. Cooper, F. A. Wolheim, R. Hong, R. A. Good, J. Exp. Med., **123**, 615 (1966).
4. P. Brandtzaeg, Nature, New Biology, **243**, 142 (1973).
5. J. P. Mach, Nature, **228**, 1278 (1970).
6. J. Radl, F. Klein, P. Van der Berg, A. M. de Bruyn, W. Hijmans, Immunology, **20**, 843 (1971).
7. J. Mestecky, R. E. Schrohenloher, R. Kulhavy, G. P. Wright, M. Tomana, Adv. Exp. Med. and biology vol. 45, The immunoglobulin A system, Ed. J. Mestecky, Plenum Press, 1974, p. 99.
8. E. Lindh, J. Bjork, Eur. J. Biochim., **45**, 261 (1974).
9. M. S. Halpern, M. E. Koshland, Nature, **228**, 1276 (1970).
10. T. Eskeland, P. Brandtzaeg, Immunochemistry, **11**, 161 (1974).
11. P. Brandtzaeg, Acad. J. Immunol., **5**, 411 (1976).
12. L. Buzilă, C. Motaş, St. cerc. biochimie, **21**, 137 (1978).
13. R. W. Newcomb, D. Normansell, D. R. Standworth, J. Immunol., **101**, 905 (1968).
14. J. Mestecky, R. Kulhavy, F. W. Kraus, J. Immunol., **108**, 738 (1972).
15. T. Muramatsu, J. Biol. Chem., **246**, 5535 (1971).
16. N. Koide, T. Muramatsu, J. Biol. Chem., **248**, 4897 (1974).
17. P. Brandtzaeg, Scand. J. Immunol., **4**, 309 (1975).
18. J. Radl, Immunology, **19**, 137 (1970).
19. O. Ouchterlony, Acta pathol. Microbiol., **26**, 507 (1949).
20. B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404 (1964).
21. P. Brandtzaeg, Immunology, **20**, 323 (1971).
22. P. Brandtzaeg, Immunochemistry, **14**, 179 (1977).
23. L. Buzilă, C. Motaş, Z. Moldoveanu, Rev. Roum. Biochim., in press.
24. C. Cunningham-Rundles, M. E. Lamm, J. Biol. Chem., **250**, 1987 (1975).
25. E. Lindt, J. Bjork, Eur. J. Biochem., **62**, 263 (1976).
26. B. J. Underdown, Biochem. Biophys. Res. Commun., **62**, 54 (1975).
27. T. B. Tomasi, J. Immunol., **112**, 2274 (1974).
28. A. Schimizu, F. W. Putnam, C. Paul, J. R. Clamp, I. Johnson, Nature, **231**, 73 (1971).
29. S. Iscaki, C. Geneste, J. Pillot, Immunochem., **15**, 401 (1978).

BIBLIOGRAFIE

1. T. R. Tomas, T. R. Solomon, R. A. Fernandezat, J. exp. Med., **121**, 101 (1965).
2. R. Bhanotzaro, Clin. Exp. Immunol., **6**, 69 (1971).
3. M. A. Soper, M. D. Cooper, F. A. Wortinix, R. Hone, R. A. Good, J. Exp. Med., **123**, 615 (1966).
4. R. Bhanotzaro, Nature, New Biology, **243**, 142 (1973).
5. J. F. Vaen, Nature, **228**, 1278 (1970).
6. J. Rajt, R. Kleis, P. Van der Bang, A. M. de Ehevn, W. Hamans, Immunology, **20**, 843 (1971).
7. J. Mestecky, R. E. Sonnenstrenne, R. Kerlhavy, G. F. Winert, M. Tomana, Adv. Exp. Med. and Biology vol. 45, The Immunopublih A system, Ed. J. Mestecky, Plenum Press, 1974, p. 99.
8. E. Lenon, J. Bjork, Eur. J. Biochim., **45**, 261 (1974).
9. M. S. Halpern, M. E. Koshland, Nature, **228**, 1276 (1970).
10. T. Erikland, P. Bhanotzaro, Immunochemistry, **11**, 161 (1974).
11. P. Bhanotzaro, Acad. J. Immunol., **5**, 111 (1976).
12. I. Björk, C. Notas, Sc. cerr. biochimie, **21**, 137 (1976).
13. R. W. Newcome, D. Newmanssir, D. R. Stanesworth, J. Immunol., **101**, 905 (1968).
14. J. Mestecky, P. Kerlhavy, F. W. Kraus, J. Immunol., **108**, 738 (1972).
15. T. Merkamatsu, J. Biol. Chem., **246**, 5535 (1971).
16. N. Ogiom, T. Merkamatsu, J. Biol. Chem., **248**, 4857 (1974).
17. P. Bhanotzaro, Scand. J. Immunol., **4**, 309 (1976).
18. J. Rajt, Immunology, **19**, 137 (1970).
19. O. Ouchterlony, Acta pathol. Microbiol., **26**, 507 (1949).
20. B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404 (1964).
21. P. Bhanotzaro, Immunology, **20**, 323 (1971).
22. P. Bhanotzaro, Immunochemistry, **14**, 179 (1977).
23. L. Bertil, C. Notas, Z. Molbovyzaro, Rev. Roum. Biochim., in press.
24. C. Cunningham-Rundles, M. B. Lamm, J. Biol. Chem., **250**, 1987 (1975).
25. E. Lamy, J. Bjork, Eur. J. Biochem., **62**, 295 (1976).
26. R. J. Uhrenbowy, Biochem. Biophys. Res. Commun., **62**, 54 (1975).
27. T. R. Tomas, J. Immunol., **112**, 2274 (1974).
28. A. Soudmire, F. W. Putnam, C. Paul, J. R. Clamp, I. Johnson, Nature, **231**, 73 (1971).
29. S. Isaac, C. Gannete, J. Pillot, Immunochem., **15**, 401 (1978).

ACTIVITATEA UNOR ENZIME GLICOLITICE HEPATICE ÎN DIABETUL ALOXANIC

V. DARIE*, M. ŞERBAN**

Rezumat. Diabetul produs la şobolani prin administrare de aloxan determină modificări semnificative ale activităţii aldolazei şi lactatdehidrogenazei hepatice. Astfel, comparativ cu lotul martor, activitatea specifică a aldolazei scade cu 45%, iar cea a lactatdehidrogenazei cu 59%. Se discută posibilităţile prin care aloxanul poate induce modificări la nivelul glucolizei hepatice.

După cum se ştie perturbarea metabolică principală în maladia diabetică o reprezintă acumularea de glucoză în sînge şi respectiv apariţia hiperglicemiei. Această dereglare metabolică se datoreşte şi faptului că metabolizarea glucozei pe diverse căi, devine deficitară ca o consecinţă a modificării raportului insulină/glucagon (1).

Glicoliza, una din principalele căi de catabolism ale glucozei, este în general, inhibată, astfel încît o parte din glucoză va mări nivelul glicemiei (2). În secvenţa glicolizei, formată dintr-o succesiune de 12 reacţii catalizate de tot atîtea enzime, aldolaza (fructozo-1,6-difosfat liaza E. C. 4.1.2.7) şi LDH (lactat dehidrogenaza E. C. 1.1.1.27), sînt considerate două enzime cheie cu rol de reglare.

Pornind de la faptul că aloxanul induce o serie de efecte analoage diabetului produs de hiposecreţia insulinei, în această lucrare ne-am propus să stabilim dacă şi în ce măsură activităţile enzimatice ale aldolazei şi LDH sînt afectate în cazul inducerii diabetului aloxanic.

MATERIAL ŞI METODE

S-a lucrat pe şobolani masculi din rasa Sprague-Dowley în vîrstă de 6—8 luni şi cu o greutate cuprinsă între 225—335 g. Experienţele s-au efectuat pe două loturi: un lot normal şi un lot la care s-a produs experimental diabet aloxanic. Inducerea diabetului aloxanic s-a realizat prin injectarea intraperitoneală a unei doze de aloxan de 12,5 mg/100 g corp în soluţie tampon fosfat-citrat de pH 3,5, în concentraţie de 10 mg/ml. Determinarea glicemiei a relevat o manifestare trifazică şi s-a considerat că şobolanii sînt în stare diabetică din momentul în care s-a instalat o fază de hiperglicemie permanentă cu valori cuprinse între 450—650 mg glucoză/100 ml. Animalele au fost sacrificate prin exanghinare cardiacă, prelevîndu-se sîngele şi ficatul. Sîngele a fost recoltat pe heparină, iar din plasma obţinută prin centrifugare s-a dozat glucoza prin metoda cu orto-toluidină (3), valorile glicemiei fiind exprimate în mg glucoză la 100 ml plasmă. Ficatul prelevat a fost spălat repetat cu ser fiziologic la rece şi ulterior omogenizat într-un omogenizator tip POTTER, în soluţie tampon TRIS-HCl pH 7,4; raportul de extracţie a fost 1 g ţesut la 3 ml soluţie tampon. Omogenatul a fost centrifugat la rece timp de 30 min la 5000×g. Supernatantul astfel obţinut a fost diluat cu apă distilată în proporţie de 1/9, fiind astfel utilizat

pentru dozarea activităţii enzimatice. Activitatea aldolazei a fost determinată prin metoda Burns-Puls (3), iar rezultatele au fost exprimate în micromoli/min/g proteină.

Activitatea LDH a fost determinată prin metoda spectrofotometrică (3), iar rezultatele au fost exprimate în micromoli/min/g proteină. Datele obţinute au fost prelucrate statistic.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele obţinute sînt prezentate în tabela 1, în care sînt consemnate valorile activităţii specifice a celor două enzime, la lotul martor şi la cel tratat cu aloxan (tabela 1). În figura 1 sînt redate grafic modificările activităţii celor două enzime, determinate din ficatul animalelor cărora le-a fost administrat aloxan în comparaţie cu lotul martor (figura 1).

Tabela 1

Activităţile specifice ale aldolazei şi lactatdehidrogenazei hepatice la lotul martor şi la lotul tratat cu aloxan

	Aldolaza micromoli/min/g proteină	Lactat de hidrogenaza micromoli/ min/g/proteină
Ficat lot normal $\bar{X} \pm S\,m$	13,01 ± 0,74	30,89 ± 1,33
Ficat lot aloxanizat $\bar{X} \pm S\,m$	7,19 ± 0,34	12,68 ± 0,52
Testul „Student"	$8{,}6454 \frac{S}{p < 0{,}001}$	$12{,}1172 \frac{S}{p < 0{,}001}$
Activitate faţă de normal %	55,30 %	41,05
Inhibiţie %	44,70 %	58,95

Din datele prezentate, rezultă că administrarea aloxanului induce modificări ale activităţilor celor două enzime investigate. Se constată astfel că activitatea aldolazei hepatice la lotul cu aloxan este diminuată, reprezentînd 55,30% din valoarea activităţii găsite în ţesutul hepatic al animalelor martor şi de asemenea se remarcă şi o scădere a activităţii LDH care, în cazul lotului tratat cu aloxan, reprezintă 41,05% în raport cu activitatea LDH constatată la lotul martor.

Rezultatele obţinute reflectă faptul că în cazul diabetului aloxanic are loc o inhibare a glicolizei evidenţiată prin activitatea redusă a acestor enzime. Se poate presupune că în lanţul glicolitic, fluxul degradării hexozofosfaţilor, înregistrează o inhibiţie cantitativ mai mică decît fluxul catabolic al triozofosfaţilor pînă la piruvat şi acid lactic, aloxanul determinînd o diminuare accentuată a glicolizei. Deci, se poate afirma că în diabetul experimental de tip aloxanic, ca şi în diabetul uman de altfel, catabolismul glucozei prin intermediul căii Embden-Meyerhoff nu repre-

zintă o modalitate de scădere a concentrației de glucoză din sînge, care rămîne la un nivel ridicat, menținîndu-se starea de hiperglicemie (4).

Este posibil ca aloxanul să afecteze activitatea unor enzime celulare prin formarea unor complexe cu cofactorii respectivi sau prin inhibiție necompetitivă. Procentul de inhibiție depinde de o serie de factori printre care sursa celulară a enzimei și concentrația de aloxan utilizată.

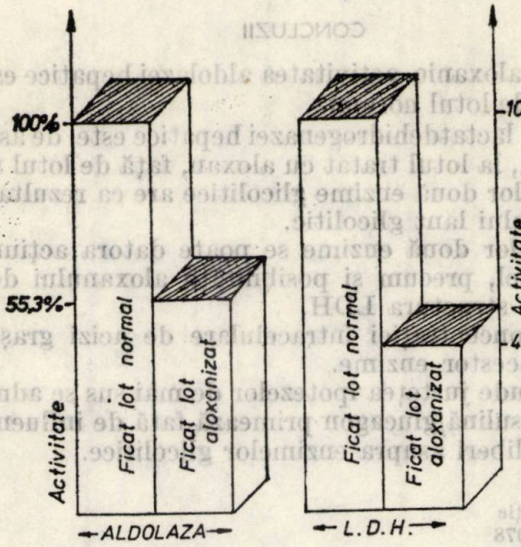


Fig. 1. — Activitățile aldolazei și lactatdehidrogenazei din ficat provenit de la șobolani normali și cu diabet aloxanic.

Aldolaza are un număr important de grupări —SH(28—29 per moleculă) dintre care esențiale pentru activitatea enzimatică sînt 16 grupări (5). După teoria elaborată de Lazarow (6), inhibiția enzimei de către aloxan este posibilă datorită afinității acestuia pentru gruparea tiol. Un mecanism analog este menționat și în cazul lactatdehidrogenazei, enzimă care, pe lîngă grupările —SH, mai necesită pentru activitatea sa și prezența zincului cu care aloxanul formează un chelat (7). De altfel, lucrări recente semnalează existența unei corelații pozitive între excreția urinară de zinc și conținutul plasmatic în lactatdehidrogenază, în cazul pacienților cu diabet zaharat (8) (9). Pe de altă parte, numeroase alte lucrări menționează, pe baza unor cercetări „in vivo" și „in vitro", efectul inhibitor al acizilor grași liberi și al esterilor acestora, asupra enzimelor implicate în metabolismul glucidic și lipidic (10). De altfel, în lucrări anterioare s-a constatat creșterea concentrației intracelulare de acizi grași liberi în diabetul uman și experimental (11) (12).

Pe baza acestor date se poate acredita faptul că în diabetul aloxanic, efectul exercitat de către aloxan asupra enzimelor, s-ar datora și creșterii nivelului acizilor grași liberi.

Rezultatele noastre experimentale aduc astfel unele dovezi asupra posibilităților și cauzelor prin care este posibilă inhibarea glicolizei de către

aloxan. Fără a exclude justețea teoriei lui Lazarow, considerăm însă că influența exercitată prin modificarea raportului insulină/glucagon, datorită modificărilor morfologice ce au loc în pancreasul exocrin sau mai precis datorită distrugerii selective a celulelor beta pancreatice, primează față de influența directă a aloxanului asupra enzimelor glicolitice. Cercetările noastre ulterioare vor avea ca obiect aducerea de precizări în acest sens.

CONCLUZII

1. În diabetul aloxanic, activitatea aldolazei hepatice este diminuată pînă la 55,3% față de lotul normal.
2. Activitatea lactatdehidrogenazei hepatice este, de asemenea, diminuată pînă la 41,0%, la lotul tratat cu aloxan, față de lotul normal.
3. Inhibiția celor două enzime glicolitice are ca rezultat o diminuare accentuată a întregului lanț glicolitic.
4. Inhibiția celor două enzime se poate datora acțiunii aloxanului asupra grupărilor tiol, precum și posibilității aloxanului de a forma un chelat cu zincul din structura LDH.
5. Creșterea concentrației intracelulare de acizi grași liberi poate inhiba activitatea acestor enzime.
6. Fără a exclude justețea ipotezelor de mai sus se admite că modificarea raportului insulină/glucagon primează față de influența aloxanului sau a acizilor grași liberi asupra enzimelor glicolitice.

Prezentat la redacție
la 31 octombrie 1978

*) *Facultatea de Medicină din Craiova, Disciplina de Biochimie*
**) *Facultatea de Medicină Veterinară București, Disciplina de Biochimie*

L'ACTIVITÉ DE QUELQUES ENZYMES GLYCOLITIQUES HÉPATIQUES DANS LE DIABÈTE ALLOXANIQUE

RÉSUMÉ

Le diabète, produit aux rats par l'administration de l'alloxane, induit des modifications significatives au niveau de l'activité de l'aldolase et de la lactate déshydrogenase hépatiques. Par rapport au témoin, l'activité spécifique de l'aldolase diminue de 45% et celle de la lactate déshydrogenase de 59%. On discute les possibilités par lesquelles l'alloxane peut induire des modifications au niveau de la glycolise hépatique.

BIBLIOGRAFIE

1. Iulian Mincu, *Diabetul zaharat*, Edit. med. București (1977).
2. M. Debot, *Diabète et maladies de la nutrition*, Flammarion Medicine Sciences Paris (1972).

3. R. Richterich, *Clinical chemistry. Theory and practice.* Acad Press, New York, London (1969).
4. W. Hansen, P. Bottermann, Diabetologia, **11**, 445—443 (1975).
5. A. D. Swensen, P. D. Boyer, J. Am chem. Soc., **79**, 2174 (1974).
6. A. Lazarow, *Experimental diabetes*, Thomas, Springfield, Illinois (1954).
7. Y. Inoue, Endocrinol. Japon, **15**, *1*, 1 (1968).
8. M. C. Martin Mateo, J. Bustamante, Biomedicine, **22**, 134—136 (1975).
9. S. Kumar, K. Yaya, Nutr. metab., **17**, 231—235 (1974)
10. E. Shafrir, N. B. Ruderman, Diabetologia, **1**, 731—742 (1974).
11. V. Darie, D. Tănăsescu, T. Ciocoiu, An. Univ. Craiova S. St. Med., **83—90** (1976).
12. V. Darie, D. Tănăsescu, C. Stancu, An. Univ. Craiova, S. St Med., **2** (1977).

PEROXIDAZELE ŞI CATALAZELE SEMINŢELOR DE GRÎU ÎN PERIOADA DEZVOLTĂRII ACESTORA

IOANA HAGIMA

Rezumat. S-au cercetat electroforetic în gel de agar, în tampon acid clorhidric—barbiturat de sodiu pH=8,2 formele moleculare multiple ale peroxidazei şi catalazei din seminţe de grîu în fazele de: lapte, lapte-ceară, maturitate, repaus seminal şi apte de germinare. S-a lucrat pe soiurile româneşti Iulia şi F—26—70. Enzimogramele celor două enzime sînt specifice pentru fiecare soi (ca număr al formelor moleculare şi ca mobilitate electroforetică) şi pentru fiecare fază analizată.

Studiul modificărilor cantitative şi calitative ale activităţii unor enzime în timpul creşterii şi maturării grîului a mai făcut obiectul cîtorva lucrări. Astfel, Preston şi Kruger (1) s-au ocupat de localizarea şi activitatea enzimelor proteolitice prezente în grîu în dezvoltare. Kruger şi La Berge (2) au analizat schimbările în activitatea peroxidazei care apar în ţesuturile individuale ale bobului în dezvoltare. Aceşti autori au depistat aproximativ 12 izoperoxidaze prezente în seminţele imature de grîu şi localizate în diferitele părţi ale seminţei. Milius (3) a studiat diferite organe (frunze, rădăcini, internodii, seminţe) în dezvoltarea ontogenetică a grîului diploid de primăvară sub aspectul variaţiei izoenzimelor cîtorva enzime, printre care şi peroxidaza.

În prezentul studiu ne-am propus urmărirea schimbărilor calitative ale peroxidazei şi catalazei în diferite etape ale umplerii bobului, în repausul seminal prezent după recoltare şi în seminţe apte de germinare. Paralel, am avut în vedere şi surprinderea unor diferenţe sub aspect electroforetic între cele două soiuri luate în studiu şi care posedă o capacitate diferită de acumulare a proteinei.

MATERIAL ŞI METODE

S-a lucrat pe soiurile de grîu Iulia şi F 26—70 create în institutul nostru. S-au analizat seminţe începînd cu faza de lapte, lapte-ceară, maturitate, repaus seminal şi terminînd cu etapa cînd seminţele erau apte de germinare. Plantele au înflorit la ambele soiuri la 19 mai 1975 şi recoltarea probelor pentru analiză s-a efectuat la 10, 21 şi 31 zile de la înflorire pentru perioada propriu-zisă de umplere a bobului, la 44 zile de la înflorire pentru etapa de maturitate şi la 59 şi 74 zile de la înflorire pentru perioada de repaus seminal; după un interval de încă 30 zile s-au analizat seminţele apte de germinare. Boabele din perioada de umplere s-au curăţat de palee şi s-au păstrat îngheţate la —12°C pînă în momentul analizei lor. S-a lucrat pe boabe întregi, care s-au mojarat, iar ca extractant s-a utilizat soluţia tampon Tris—HCl 0,1 M, pH=7, 5, cu adaus de EDTA — Na_2 0,003 M. Raportul de extracţie a fost o parte material cu 2 părţi extractant. După 30 min de extracţie la temperatura camerei, extractul s-a centrifugat la 5000 g timp de 15 min, iar supernatantele diluate convenabil s-au folosit pentru electroforeză.

Electroforeza s-a realizat în gel de agar (BDH) 1,5 %, în tampon HCl — barbiturat de

sodiu, pH=8,2 la 200 V, 0,65 mA/cm, timp de 6 ore, pe plăci de sticlă de 15×3 cm. Stratul s-a aplicat la mijlocul plăcii.

Evidenţierea activităţii peroxidazei s-a făcut cu benzidină, iar a activităţii catalazei cu apă oxigenată, după metode descrise anterior (4).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Formele moleculare ale peroxidazei. În perioada de umplere a bobului formele moleculare ale proxidazei suferă modificări. S-au relevat particularităţi legate atît de soi, cît şi de etapa investigată. La soiul *Iulia* numărul formelor moleculare ale peroxidazei variază între 7 şi 13 în funcţie de etapa analizată (fig. 1). Astfel, la 10 zile după înflorire s-au evidenţiat 11 forme

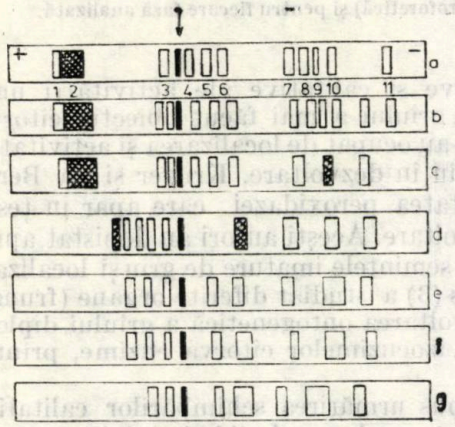


Fig. 1. — Enzimogramele peroxidazei din seminţe de grîu din soiul Iulia, în fazele:

a, b şi *c* — la 10, 21 şi respectiv 31 zile de la înflorire (perioada propriu-zisă de umplere a bobului); *d* — 44 zile de la înflorire (maturitatea bobului); *d, f* — 59 şi 74 zile de la înflorire (repaus seminal); *g* — 105 zile de la înflorire (apte de germinare).

→ origine

moleculare, dintre care 3 fracţiuni situate de la start spre anod şi 8 fracţiuni situate de la start spre catod. Dintre cele 11 fracţiuni, fracţiunea a 2-a se remarcă printr-o activitate intensă care se menţine în toată perioada de umplere a bobului. La 21 zile de la înflorire asistăm la creşterea numărului de forme moleculare, astfel că s-au depistat 4 fracţiuni de la start spre anod şi 9 fracţiuni de la start spre catod. Pe măsură ce procesul de umplere a bobului avansează, numărul fracţiunilor peroxidazice scade, astfel că s-au relevat 4 fracţiuni de la start spre anod şi numai 6 fracţiuni de la start spre catod (31 zile de la înflorire). Scăderea numărului de fracţiuni are loc pe seama fracţiunilor de la capătul catodic al plăcii; remarcăm însă că fracţiunile rămase posedă o activitate mai mare. Seminţele mature (44 zile de la înflorire) se remarcă prin deosebiri pregnante faţă de etapele anterioare; dispar primele două fracţiuni puternic electronegative şi apar alte 3 fracţiuni, astfel că peroxidaza prezentă de la start spre anod se prezintă divizată în cinci forme moleculare. Din primul grup de fracţiuni de la start spre catod constatăm existenţa evidentă doar a unei singure fracţiuni; grupul următor nu suferă modificări. La seminţele în repaus seminal are loc o scădere şi mai severă a numărului de forme moleculare pe baza fracţiunilor de la start spre anod, astfel că în cele două etape de repaus

seminal am depistat 8 fracţiuni peroxidazice : 3 de la start spre anod şi 5 de la start spre catod. Seminţele apte de germinare relevă 6 fracţiuni : 2 spre anod şi 5 spre catod.

Enzimogramele peroxidazei din seminţe aparţinînd soiului *F 26—70* (fig. 2) au trăsături atît comune, cît şi specifice, comparativ cu cele ale soiului Iulia.

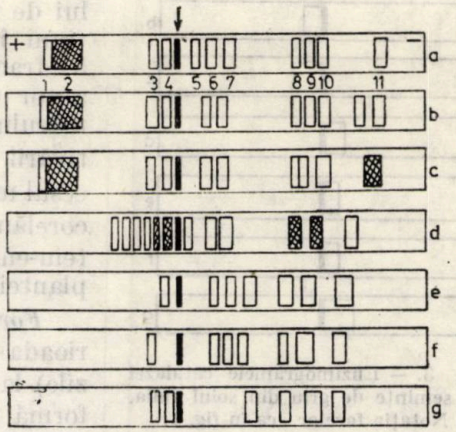


Fig. 2. — Enzimogramele peroxidazei din seminţe de grîu din soiul F 26—70 Notaţiile fazelor analizate sînt aceleaş ca în fig. 1.

În prima etapă analizată s-au evidenţiat tot 11 fracţiuni ca şi la soiul Iulia, dar 4 spre anod şi 7 spre catod. Fracţiunea a 2-a cu activitate intensă este prezentă şi la soiul F 26—70 în toată perioada de umplere a bobului. La 21 zile de la înflorire, comparativ cu soiul Iulia, se observă dispariţia fracţiunii de la start spre catod, iar la 31 zile de la înflorire ultimele două fracţiuni dinspre catod apar ca o singură fracţiune. În etapa de seminţe analizate la 44 zile de la înflorire, zona de la start spre anod conţine 6 forme moleculare, asistînd la aceeaşi divizare a activităţii, ca şi la soiul Iulia. De la start spre catod observăm 6 fracţiuni, dintre care a 10-a şi a 11-a au o activitate puternică. În cele două etape de repaus seminal enzimogramele prezintă, ca şi la soiul Iulia, un număr mai redus de forme moleculare. Se remarcă o fracţiune spre anod cu mobilitate diferită în funcţie de perioada analizată şi 6 fracţiuni spre catod dispuse în două grupuri. La seminţele apte de germinare aspectul enzimogramei redă două fracţiuni de la start spre anod şi 4 de la start spre catod.

Din cele prezentate reiese că procesul de umplere a bobului se caracterizează prin forme electronegative (ţinînd cont de curentul de electroendosmoză). În seminţele mature dispar formele moleculare puternic electronegative şi apar 2—3 forme moleculare (în funcţie de soi) mai aproape de start. Totodată creşte activitatea enzimatică a fracţiunilor situate de la start spre catod. Prezenţa repausului seminal are ca efect scăderea în continuare a numărului fracţiunilor situate de la start spre anod. Această scădere este mai accentuată la soiul F 26—70 (de la 12 la 7) comparativ cu soiul Iulia (de la 9 la 8). Într-o lucrare anterioară privind repausul seminal la cele două soiuri (4) am remarcat diferenţa între ele sub aspectul duratei perioadei repausului seminal, soiul F 26—70 avînd o durată a perioadei mai scurtă. Comportarea de faţă o corelăm, pe lîngă

specificitatea de soi și cu acest important parametru biologic. La semințele apte de germinare dispar 1—2 fracțiuni situate de la start spre catod, comparativ cu etapa repausului seminal. Milius (3) a constatat de asemenea că enzimogramele peroxidazei s-au modificat atît calitativ, cît și cantitativ în timpul maturării, evoluția ontogenetică fiind însoțită de o scădere a numărului de forme moleculare (de la 11 fracțiuni în semințele în faza de lapte la 5 fracțiuni în cele mature). Același autor emite părerea că descreșterea numărului de fracțiuni s-ar datora dezactivării sau chiar dispariției lor în procesul maturării. Considerăm că trebuie să corelăm aceste modificări în sinteza protein-enzimelor cu necesitățile concrete ale plantei, întipărite genetic.

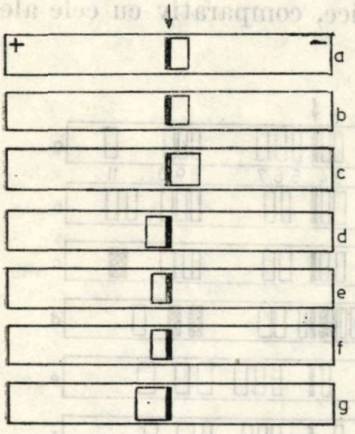


Fig. 3. — Enzimogramele catalazei în semințe de grîu din soiul Iulia. Notația fazelor, ca în fig. 1.

Formele moleculare ale catalazei. În perioada de umplere a bobului (primele 31 zile) la soiul *Iulia* s-a depistat o singură formă moleculară situată pe start și spre catod (fig. 3). Activitatea acestei forme moleculare a catalazei este cea mai intensă în jurul zilei a 31-a de la înflorire. maturitate (44 zile de la înflorire) semințele conțin tot o singură formă moleculară, dar situată pe start și spre anod. Enzimogramele din timpul repausului seminal redau de asemenea o singură formă moleculară cu activitate enzimatică mai redusă, situată de la start spre anod. Modificarea mobilității electroforetice a formei moleculare a catalazei se corelează cu etapele diferite de dezvoltare pe care le parcurge bobul. Terminarea perioadei de umplere a bobului este marcată deci de modificarea netă a mobilității electroforetice a formei moleculare a catalazei. Semințele de grîu apte de germinare relevă o singură formă moleculară, situată tot de la start spre anod, dar cu o activitate mai intensă decît în etapa de repaus seminal.

Electroforegramele catalazei din semințele soiului *F 26—70* prezintă aceeași dinamică a moleculelor enzimei cu anumite particularități de soi. Astfel, la 10 zile de la înflorire s-a observat că banda catalazei este formată din două forme moleculare : una în zona startului și cea de-a doua, situată spre catod (fig. 4). În etapele următoare se relevă o singură formă moleculară, ca și la soiul Iulia, cu deosebirea că mobilitatea electroforetică nu se schimbă. Faptul că la 44 zile de la înflorire forma moleculară a catalazei nu-și schimbase mobilitatea denotă expresia unui caracter

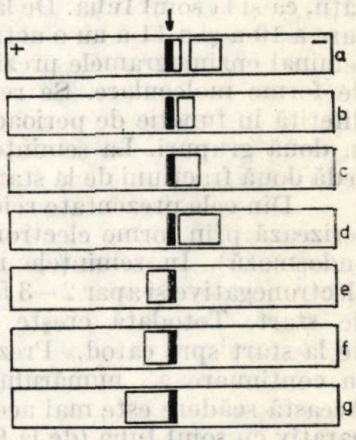


Fig. 4. — Enzimogramele catalazei din semințe de grîu din soiul F 26—70. Notațiile fazelor, ca în fig. 1.

genetic. Schimbarea mobilităţii electroforetice am surprins-o abia în perioada de repaus seminal şi nu la 44 zile de la înflorire, ca la soiul Iulia. Comparativ cu enzimogramele soiului Iulia, cele aparţinînd soiului F 26—70 se remarcă printr-o activitate semnificativ mai intensă.

Savchenko şi Biryukov (5) au relevat descreşterea activităţii peroxidazei în timpul coacerii unui soi de grîu, concomitent cu creşterea conţinutului de proteine şi a activităţii catalazei.

CONCLUZII

1. Enzimogramele peroxidazei şi catalazei sînt specifice pentru fiecare soi ca număr al formelor moleculare şi ca mobilitate electroforetică.

2. Pe măsură ce procesul umplerii bobului avansează, numărul formelor moleculare ale peroxidazei se reduce, mai evident la soiul F 26—70.

3. Caracteristic perioadei de umplere a bobului este prezenţa, la ambele soiuri, a unei forme moleculare anodice intense pentru peroxidază; acest tablou poate servi pentru estimarea momentului pe care îl traversează sămînţa în dezvoltarea ei.

4. În seminţele mature se evidenţiază la ambele soiuri, un număr mai mare de fracţiuni peroxidazice spre anod.

5. Repausul seminal, comparativ cu etapele anterioare, este însoţit de modificarea semnificativă a mobilităţii electroforetice a formei moleculare a catalazei.

6. La seminţele apte de germinare se remarcă, la ambele soiuri, scăderea numărului de fracţiuni peroxidazice, comparativ cu etapele anterioare analizate.

Prezentată la redacţie
la 18 noiembrie 1978

Institutul de cercetări pentru
cereale şi plante tehnice
Fundulea
Colectivul de Biochimie

PEROXIDASES AND CATALASES IN WHEAT SEEDS DURING THEIR GROWTH PERIOD

SUMMARY

Multiple molecular forms of peroxidase and catalase by agar gel electrophoresis in HCl—Na barbiturate buffer, pH = 8.2 in wheat seeds were studied in the following stages: milky stage, milky-waxy stage, maturity, seed dormancy and ability to germinate. The experiments were performed on two Romanian varieties, Iulia and F26—70. Peroxidase and

catalase patterns are specific both for each variety (as well as number of molecular forms and electrophoretical mobility) and for each analysed stage.

BIBLIOGRAFIE

1. K. Preston, J. Kruger, Canad. J. Plant Sci., **56**, 217 (1976).
2. J. E. Kruger, D. E. La Berge, Cereal Chem., **51**, 345 (1974).
3. A. Milius, Biologhia, **22**/*3*, 254 (1973).
4. Ioana Hagima, Victoria Alexandrescu, Zoia Cseresnyes, Rev. Rom. Biochim., **15**, 273 (1978).
5. M. P. Savchenko, A. I. Biryukov, Tr. Omsk. Sel'skokhoz. Inst., **92**, 81 (1971).

ROLUL PĂRŢII GLUCIDICE ÎN DEGRADAREA INTRACELULARĂ A PROTEINELOR
VII. PROTEOLIZA CONTROLATĂ CU PAPAINĂ A IgM NATIVĂ ŞI TRATATĂ CU UN AMESTEC GLICOZIDAZIC DIN *DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE*

CORINA MIHAIL, CECILIA MOTAŞ, FLORICA MIHALCU

Rezumat. IgM a fost parţial deglucidizată prin acţiunea unui amestec glicozidazic din *Diplococcus pneumoniae*. Ulterior a fost supusă hidrolizei controlate cu papaină în prezenţa mercaptoetilaminei (MEA) $2 \cdot 10^{-3}$ M, comparativ cu IgM nativă şi cu IgM tratată numai cu MEA. Comportarea IgM a fost urmărită prin dublă difuzie, imunoelectroforeză, disc electroforeză în gel de poliacrilamidă şi prin imunoelectroforeză încrucişată. S-au obţinut, IgM_p şi respectiv IgM_s împreună cu un alt component cu greutate moleculară mai mare. Datele cantitative indică implicarea lanţurilor oligozaharidice în reglarea procesului de scindare a IgM, deoarece îndepărtarea lor parţială conduce la o hidroliză mai accentuată a IgM.

Imunoglobulina M umană pare să fie una dintre cele mai adecvate glicoproteine în elucidarea rolului părţii ei glucidice legată de proteină, deoarece îi sînt cunoscute structura cuaternară (1), localizarea legăturilor -SS- (1), precum şi structura şi locurile de prindere a lanţurilor ei eterozaharidice (2) (3) (4) (5) (6).

Numeroasele cercetări referitoare la funcţia părţii glucidice a IgM, demonstrează implicarea sa în polimerizarea lanţurilor polipeptidice în timpul biosintezei (7) sau în reasocierea spontană în IgM pentameră a IgM redusă sau a fragmentelor Fcμ, libere de lanţ J (8) (9), în ciuda faptului că adăugarea treptată de unităţi monozaharidice, nu pare să controléze procesul de polimerizare (10), ori că lanţul J pare să fie factorul de control al polimerizării IgM (11) (12).

Asemănarea între IgM bovină sau porcină şi IgM umană referitor la aranjarea legăturilor disulfidice inter-lanţ şi localizarea glucidului, sugerează că aceste particularităţi structurale ar putea fi caracteristici fundamentale ale moleculei de IgM şi pot fi esenţiale pentru corecta funcţionare a moleculei (9) (13).

S-a demonstrat că unele glicoproteine sînt rezistente la proteoliză (14) (15) (16) (17) şi că odată cu modificarea părţii glucidice, fie la capătul terminal, acidul neuraminic (18) (19) (20) fie la nivelul β-N-acetilglucozaminei interne (21) (22), devin mai susceptibile la proteoliză.

În această lucrare am urmărit dependenţa degradării IgM de prezenţa părţii glucidice, folosind o imunoglobulină M a cărei lanţuri glucidice au fost îndepărtate parţial prin acţiunea unui amestec de glicozidaze din

Diplococcus pneumoniae (23). Ca agent proteolitic s-a folosit papaina, conform indicațiilor lui Inman și Hazen (24), în vederea obținerii unui fragment mare, de tip IgM_s, care își menține intacte legăturile interlanțuri, denumit de autori IgM_p. În felul acesta s-a putut face controlul asupra proteolizei, IgM intactă fiind martorul acțiunii glicozidazelor.

Am ales acest tip de hidroliză, deoarece papaina acționează asupra lanțului μ în imediata apropiere a punților -SS- intermoleculare din domeniile C_H3 și a lanțurilor oligozaharidice C_3 și C_4. Subunitatea IgM_p, contrar subunității IgM_s obținută prin reducere, își va menține o parte apreciabilă a conformației originale.

Stricta apropiere între lanțurile oligozaharidice și locul de acțiune al papainei în condițiile indicate de Inman și Hazen (24), ne-au sugerat întrebuințarea acestui model pentru a decela eventuala implicare a părții glucidice în procesul de degradare.

MATERIAL ȘI METODE

Obținerea imunoglobulinei M. Imunoglobulina M a fost izolată din plasma unui pacient cu macroglobulinemie Waldenström (25). Preparatul euglobulinic a fost obținut prin precipitarea plasmei cu un exces de 15 ori volumul ei, de apă distilată rece. Precipitatul se resuspendă în soluție salină și se reprecipită de trei ori. Precipitatul resuspendat s-a filtrat pe Sepharoză 6B în tampon Tris/HCl $5 \cdot 10^{-2}$M, pH 8,0. S-au obținut două piscuri care s-au dializat și s-au liofilizat.

Separarea și purificarea parțială a amestecului glicozidazic din Diplococcus pneumoniae. S-a lucrat cu o tulpină liofilizată (53148/Pasteur) de *Diplococcus pneumoniae* tip I de la Institutul Cantacuzino. Tulpina a fost preluată steril în cîteva tuburi cu bulion cord, preparat după Hughes și Jeanloz (26), în compoziția căruia infuzia de cord DIFCO a fost înlocuită cu macerat de cord preparat din inimi de vită în Institutul Cantacuzino. Purificarea parțială a extractului brut s-a făcut conform metodei lui Koide și Muramatsu (23). Ne-am oprit după etapa a treia, adică la trecerea pe Sephadex G-200, obținînd pentru endo-β-N-acetilglucozaminidază o purificare de aproximativ 100 ori. Testarea activității s-a făcut pe glicopeptidul albuminic (27). Preparatul obținut conține în plus β-galactozidază, neuraminidază și exo-β-N-acetil-glucozaminidază (23), care au fost determinate pe substrate specifice (26).

Acțiunea glicozidazelor asupra IgM s-a efectuat în raport de 1/5 la pH 6,5 în tampon fosfat 10^{-1}M. Probele s-au incubat 4—7 zile la 37°C, la fel și IgM folosită ca martor. Ca probă de control s-a folosit și IgM în prezența preparatului enzimatic la timpul zero (28). Piscurile proteice s-au comasat și concentrat prin perevaporare.

Gel filtrarea pe Sephadex G-100. S-a folosit o coloană de Sephadex G-100 (1,2×90 cm) echilibrată cu o soluție de bicarbonat de amoniu $5 \cdot 10^{-2}$M, pH 7,5 (29). Profilul proteic s-a realizat prin citirea extincției la 280 nm, iar glucidele s-au determinat după metoda Dubois (30).

Hidroliza cu papaină s-a practicat după Inman și Hazen (24) cu cîte 5 mg/ml IgM reluată în tampon fosfat 10^{-1}M, pH 6, 5, incubată cu glicozidază și incubată numai cu tampon. Raportul papaină/proteină a fost de 1/100. Ca activatori ai papainei s-au întrebuințat EDTA și mercaptoetilamină HCl (MEA) în concentrații de $2 \cdot 10^{-2}$M și respectiv $2 \cdot 10^{-3}$M în probă. Reacția s-a practicat 30 min. la 37°C în mediu de azot și s-a oprit prin alchilare cu iodacetamidă (IAA) $2 \cdot 10^{-2}$M la 4°C timp de 1 oră. Ca martori s-au folosit probe numai cu MEA și probe numai cu papaină, fără activator, care au fost de asemenea alchilate.

Dubla difuzie radială s-a făcut folosind un gel de agaroză 1% în ser fiziologic.

Imunoelectroforeza s-a făcut în gel de agaroză 1% în tampon veronal, pH 8,6, $\mu = 0,05$, diluat 1/3 în plăci, la 200 V, 30 mA, timp de 3 ore. S-a folosit ser monospecific anti-IgM.

Disc electroforeza în gel de poliacrilamidă s-a făcut în mediu alcalin, după indicația lui Davis (31).

Imunoelectroforeza încrucișată s-a făcut în gel de agaroză 1% în tampon veronal, diluat 1/3 în plăci, pH 8,6, la 200 V,1 mA/cm, timp de 4 ore în fiecare direcție, după indicațiile lui Ganrot (32). Raportul antiserului (anti-IgM), înglobat în agaroză a fost de 1/20.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Purificarea imunoglobulinei M a dat un profil cromatografic format din două piscuri (fig. 1) care s-au comasat separat, s-au dializat faţă de ser fiziologic şi s-au liofilizat. S-a lucrat numai cu piscul I; piscul II dădea reacţie şi cu serul anti-α_2-macroglobulină, nu numai cu serul anti-IgM.

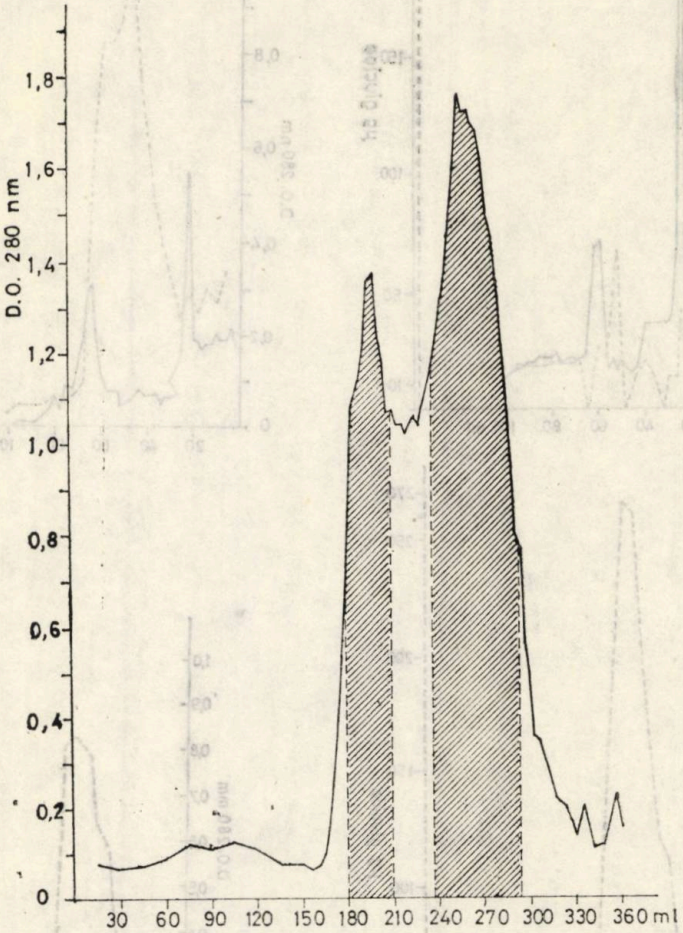


Fig. 1. — *Gel filtrarea pe Sepharoză 6B* în tampon Tris/HCl $5 \cdot 10^{-2}$M, pH 8,0 ce conţine EDTA $2 \cdot 10^{-3}$M şi NaCl $2 \cdot 10^{-1}$M, a imunoglobulinei M obţinută prin precipitări repetate cu apă distilată rece, din plasma unui pacient cu macroglobulinemie Waldenström. Porţiunile haşurate s-au comasat, concentrat şi s-au liofilizat.

S-ar putea ca piscul I întrebuinţat de noi să fie agregat „super-polimer de 25—30S", semnalat de Radl (33).

Determinarea acţiunii glicozidazelor s-a urmărit prin eliberarea glucidelor după gel filtrarea probelor pe Sephadex G-100 (fig. 2) (29). Gel

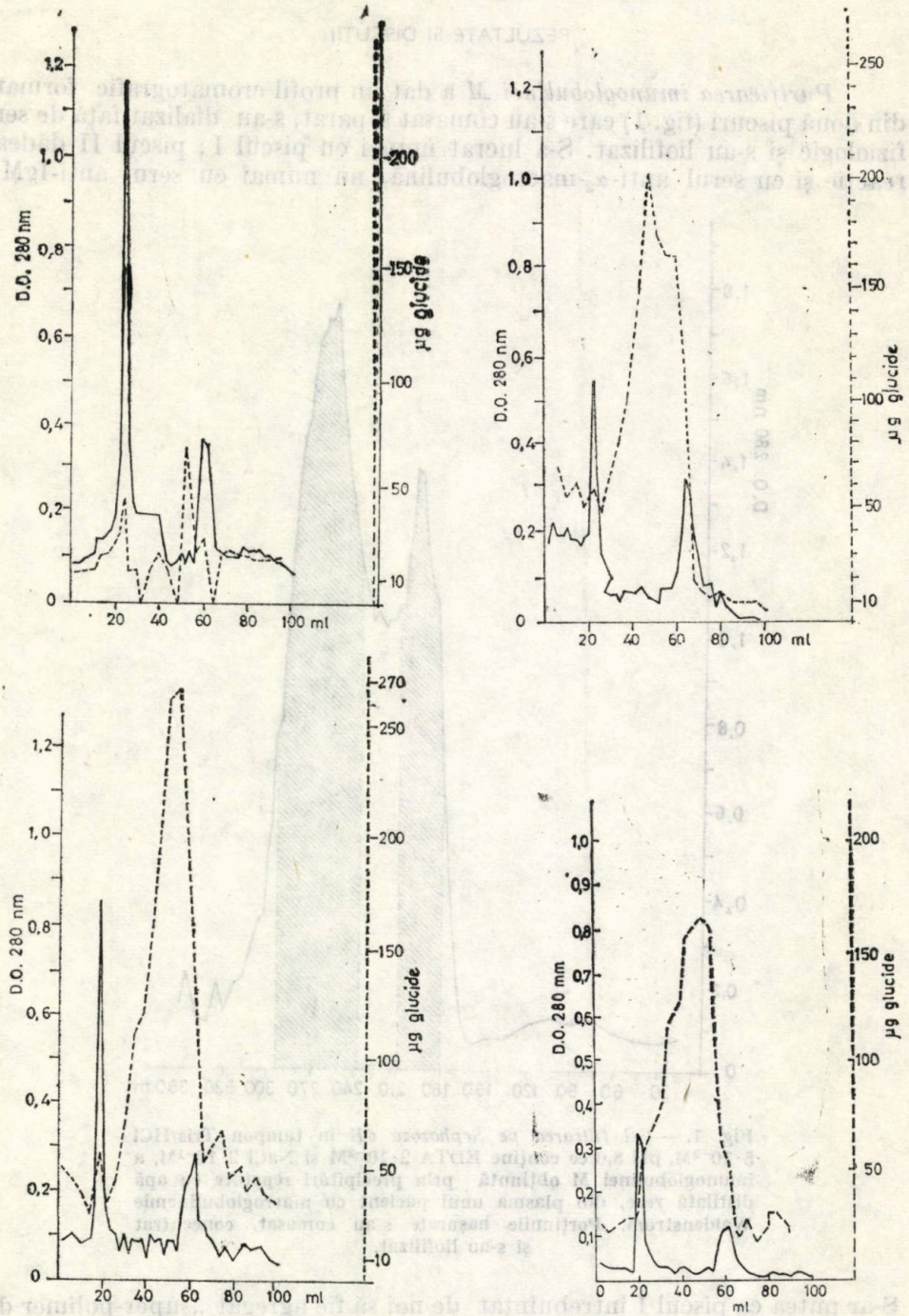


Fig. 2. — *Gel filtrarea pe Sephadex G-100* în soluție de bicarbonat de amoniu $5 \cdot 10^{-2}$M, pH 7,5 a piscului I liofilizat, obținut prin gel filtrare pe Sepharoză 6B.

a) Preparatul de IgM, după o incubare de 4 zile la 37°C ; *b*) Preparatul de IgM în prezența preparatului glicozidazic după o incubare de 4 zile la 37°C ; *c*) Preparatul de IgM în prezența preparatului glicozidazic după o incubare de 7 zile la 37°C ; *d*) Preparatul de IgM în prezența preparatului enzimatic la timpul zero.

linie continuă — proteine
linie întreruptă — glucide

filtrarea IgM nativă, după incubare de 4 zile la 37°C a pus în evidență existența a două piscuri proteice și a două piscuri glucidice (fig. 2 *a*). Preparatul de IgM în prezența preparatului glicozidazic timp de 4 zile și respectiv 7 zile la 37°C, a arătat în general același profil cromatografic (fig. 2 *b* și *c*) cu deosebirea că după o incubare de 4 zile piscul I prezintă un profil proteic mai mic față de cel al IgM native, pe cînd piscul II rămîne practic neschimbat. În schimb, profilul glucidic este mult crescut (fig. 2. *b*). Dacă se mărește timpul de incubare la 7 zile, se constată că piscul I proteic atinge o valoare mai ridicată decît în cazul incubării de 4 zile, fără a atinge însă valoarea IgM-ului nativ, piscul II se comportă tot practic neschimbat, pe cînd glucidele sînt considerabil crescute (fig. 2 *c*). Comportarea preparatului de IgM pus în prezența amestecului glicozidazic la timpul zero este arătată în figura 2 *d*.

S-a practicat acest martor, deoarece preparatul enzimatic conține glicoproteine care modifică rezultatul (28).

Piscul proteic devine, în acest caz foarte mic, ceea ce indică o „mascare" a moleculei de IgM prin interacția cu preparatul enzimatic brut.

Prin acțiunea glicozidazelor, partea proteică a IgM devine evidentă la trecerea pe coloană, progresiv cu timpul de acțiune (fig. 2, *b*, *c*).

După trecerea IgM neincubată, primul pisc proteic are aceeași valoare cu a IgM incubată în tampon 4 zile, pe cînd piscul cu greutate moleculară mică practic nu apare. Apariția lui după incubarea de 4 zile a IgM singură, denotă prezența unei impurități care se eliberează pe această cale. Este mai greu de presupus acțiunea asupra IgM a unei proteaze sanguine de tip plasmină, deoarece prezintă aceeași intensitate, independent de timpul de incubare, cu sau fără glicozidaze.

Creșterea cantității de glucide în probele post void-volum, odată cu timpul de acțiune al enzimelor glicozidazice denotă acțiunea acestor enzime asupra IgM.

Scopul lucrării noastre nu a fost de a urmări nici cantitatea, nici calitatea glucidelor eliberate și nici locul unde sînt eliberate. Scopul a fost acela de a sărăci cît mai mult posibil IgM de componentele ei glucidice. Creșterea cantității de glucide eliberate după incubarea cu glicozidaze, a fost o dovadă suficientă și este folosită la sesizarea acțiunii glicozidazelor (29).

Hidroliza cu papaină a fost efectuată cu 6 variante și anume :

1. IgM incubată în tampon.
2. IgM incubată cu glicozidaze.
3. IgM incubată cu papaină și MEA ca activator.
4. IgM incubată cu glicozidază și papaină cu MEA.
5. IgM incubată cu papaină fără MEA ca activator.
6. IgM incubată numai cu MEA.

Toate probele au fost efectuate în același timp, în aceleași volume și în aceleași cantități de reactanți. Urmărirea hidrolizei s-a făcut prin dubla difuzie radială, prin imunoelectroforeză, disc electroforeză în gel de poliacrilamidă la pH alcalin și prin imunoelectroforeză încrucișată.

Dubla difuzie radială a constat pe de o parte în testarea celor două piscuri proteice de la toate probele obținute prin gel filtrare pe Sephadex G-100 (fig. 3). S-a folosit ser monospecific anti-IgM. Au dat reacție numai piscurile I indicînd o identitate totală.

Pe de altă parte au fost analizate probele supuse hidrolizei cu papaină (fig. 4). S-au reliefat modificări în cazul probelor 3 și 4 cînd s-au obținut cîte două linii de precipitare, indicînd acțiunea de scindare a papainei atît în prezența cît și în absența amestecului glicozidazic.

Se constată totodată că MEA, în condițiile probelor 3 și 4, acționează ca reducător asupra IgM (proba 6), dînd tot două linii de precipitare, mai puțin distincte decît în cazul probelor menționate.

Nu s-au obținut modificări în cazul IgM native și nici în cazul IgM native în prezența preparatului glicozidazic.

Imunoelectroforeza a avut de asemenea ca scop testarea probelor supuse hidrolizei cu papaină și a acțiunii glicozidazelor (fig. 5). Prin această metodă s-au confirmat rezultatele obținute prin dubla difuzie asupra probelor supuse proteolizei și acțiunii glicozidazelor.

Disc electroforeza în gel de poliacrilamidă la pH alcalin (fig. 6), a demonstrat nepătrunderea, practic, în porii acestui gel a IgM native (proba *1*) (34), a probei tratată cu glicozidaze (proba *2*) și a aceleia tratată numai cu papaină, fără activator (proba *5*). În figura 6 vor fi date doar probele tratate cu papaină, fără glicozidaze (proba *3*, notată cu *a*) și celei tratate cu glicozidaze, anterior hidrolizei cu papaină (proba *4*, notată cu *b*). Mai este de semnalat și proba pusă numai în prezența activatorului MEA care este totodată și agent reducător (proba *6*, notată cu *c*).

După Inman și Hazen (24) la concentrația de $2 \cdot 10^{-3}$M a MEA, nu se produce nici o modificare a legăturilor disulfidice din molecula de IgM, ci doar o activare a papainei. După rezultatele obținute în cazul nostru cu această probă, s-ar părea că papaina singură nu are nici o acțiune asupra compusului (IgM nu a pătruns în gel), dar MEA singură, la concentrația recomandată, a modificat molecula de IgM dîndu-i posibilitatea de a pătrunde în gel cu 1/2 cm (fig. 6 *c*) și de a se separa în două benzi. Papaina cu activator modifică substanțial IgM în 30 min, deoarece se obțin două benzi distincte, cu migrare de 1 cm (fig. 6, *a*). Acțiunea anterioară a glicozidazelor influențează hidroliza cu papaină (fig. 6 *b*) reducînd viteza de migrare, concentrînd produșii într-o singură bandă la start. Scăderea numărului grupărilor glucidice, face moleculele glicoproteinelor mai puțin solubile, o altă dovadă a acțiunii glicozidazelor (29). În cazul celor 3 probe analizate, a mai rămas la start o cantitate apreciabilă de proteină.

Se pare că papaina, în cazul IgM întrebuințate de noi, evidențiază nu numai existența IgM_s, ci și a unui alt compus, cu o greutate moleculară mai mare, dar în cantitate mai redusă.

Papaina acționează asupra legăturilor peptidice de la capătul C terminal, imediat sub puntea -SS- interlanțuri (24), eliberînd fragmente mari de IgM, denumite IgM_p, foarte asemănătoare cu cele obținute prin reducerea acestei punți, deci IgM_s, care sînt de fapt IgM monomeri.

Papaina, în raportul de concentrații și timpul de acțiune recomandat (24), nu scindează toate moleculele IgM întrebuințată de noi sau o scindează și în alte locuri, eliberînd și un alt tip de fragment, cu greutate moleculară mult mai mare.

Imunoelectroforeza încrucișată (fig. 7) a fost făcută în scopul verificării cantitative a rezultatelor obținute în experiențele menționate anterior. Rezultatele sînt date în figura 7. Se constată că în acest caz IgM nativă rămîne practic pe start (fig. 7 *a*). Acțiunea papainei cu activator (fig. 7 *c*)

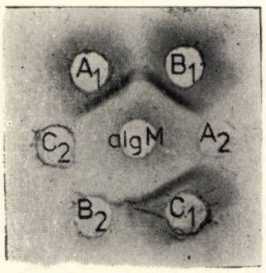


Fig. 3. — *Dubla difuzie radială a piscurilor obținute prin gel filtrare pe Sephadex G-100.* S-a folosit ser monospecific anti-IgM.

A = IgM incubată în tampon timp de 4 zile
A_1 = piscul I ; A_2 = piscul II.
B = IgM incubată cu preparatul glicozidazic timp de 4 zile.
B_1 = piscul I ; B_2 = piscul II.
C = IgM incubată cu preparatul glicozidazic timp de 7 zile
C_1 = piscul I ; C_2 = piscul II.

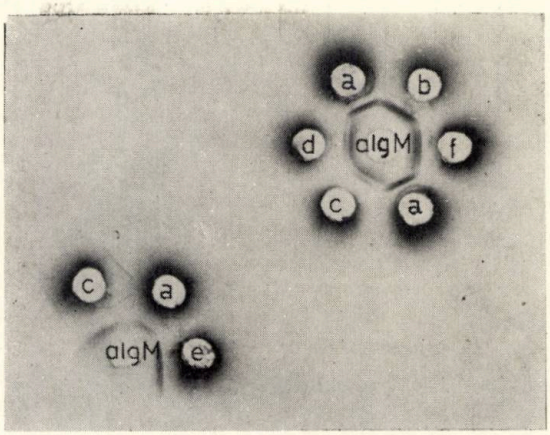


Fig. 4. — *Dubla difuzie radială a probelor supuse hidrolizei cu papaină și acțiunii glicozidazelor.* S-a folosit serul monospecific anti-IgM.

a) IgM incubată în tampon ; *b*) IgM incubată cu glicozidaze ; *c*) IgM incubată cu papaină și MEA ca activator ; *d*) IgM incubată cu glicozidaze și papaină cu MEA ca activator ; *e*) IgM incubată cu papaină fără MEA ca activator ; *f*) IgM incubată numai cu MEA.

Incubarea s-a făcut în tampon fosfat 10^{-1}M pH 6,5 timp de 4 zile.

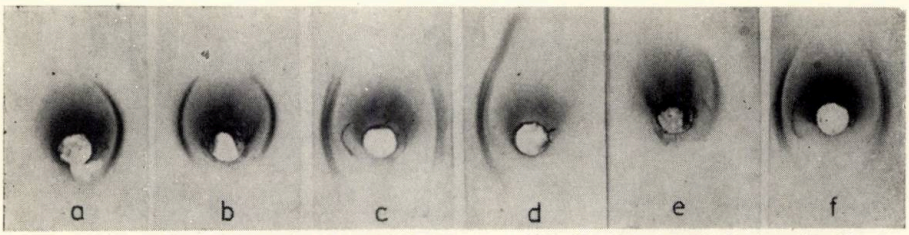


Fig. 5. — *Imunoelectroforeza probelor supuse hidrolizei cu papaină și acțiunii glicozidazelor.*

a), *b*), *c*), *d*), *e*), *f*), aceleași indicații ca în fig. 4.

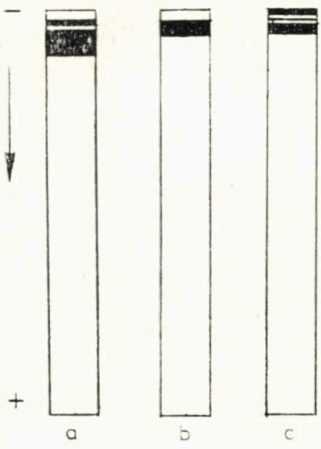


Fig. 6. — *Disc electroforeza la pH alcalin.*
a) IgM incubată cu papaină şi MEA ca activator; *b*) IgM incubată cu glicozidaze şi papaină cu MEA ca activator; *c*) IgM incubată numa ;cu MEA.

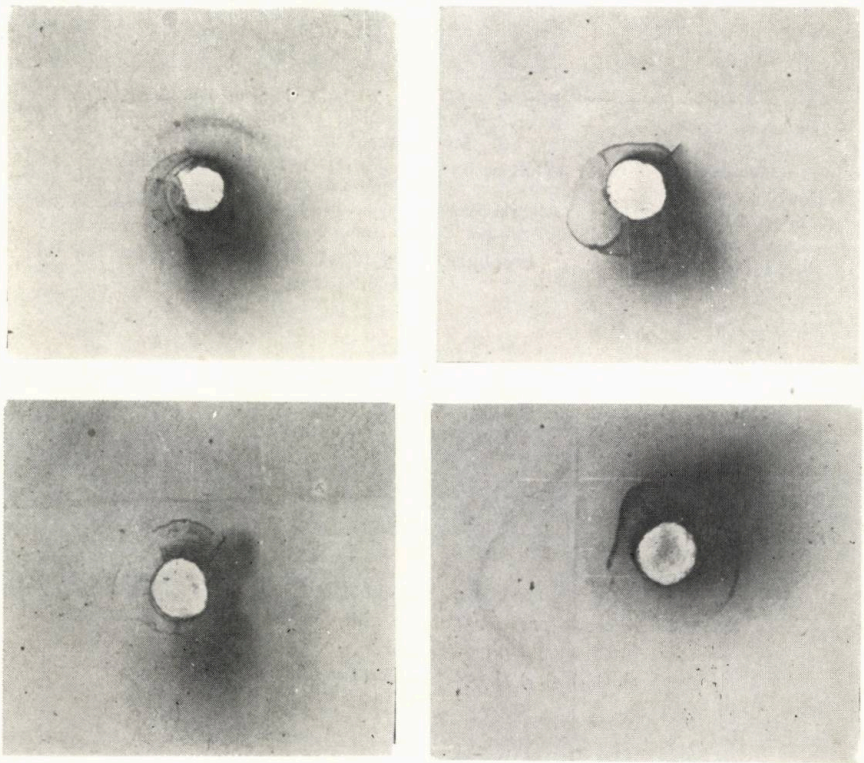


Fig. 7. — *Imunoelectroforeza încrucişată a probelor supuse hidrolizei şi acţiunii glicozidazelor.*
a), b), c), d), f), aceleaşi indicaţii ca în fig. 4.

conduce la apariţia a două arcuri de precipitare cu preponderenţa componentei cu o migrare mai pronunţată spre anod în timp de IgM supusă acţiunii glicozidazelor anterior proteolizei în prezenţa activatorului MEA (fig. 7 *d*) prezintă o imagine asemănătoare cu cea a IgM nativă care a reacţionat numai în prezenţa MEA (fig. 7 *f*).

Sînt confirmate rezultatele de la disc electroforeză, în sensul că prin acţiunea papainei activată, nu se obţine numai fragmentul IgM_p, ci şi un alt compus cu greutate moleculară mai mare care nu este IgM intactă, deoarece pătrunde în geluri. Acest al doilea arc de precipitare din dreptul startului, apare şi la probele tratate cu MEA (fig. 7 *f*) sau cu glicozidaze înaintea papainei (fig. 7 *d*).

Rezultatele noastre sînt în concordanţă cu cele ale lui Beale şi Feinstein (34) care reduc IgM cu DTT în concentraţie de 0,125 mM. Autorii obţin prin ultracentrifugare compuşi de la 19S la 7,3 S, de tipul 11S, 13S.

Tabela 1

Greutatea suprafeţelor clopotelor proteice exprimată în mg.

Proba	Arcul anodic	Arcul de la start
c. (IgM+papainăactivată)	95	47
d. (IgM+glicozidaze + papainăactivată)	135	35
f. (IgM+MEA)	107	46

Datele cantitative sînt prezentate în tabela 1.

Se constată că îndepărtarea unor glucide din molecula IgM conduce la o acţiune ulterioară mai eficientă al papainei, arcul de precipitare al fragmentului IgM_p fiind mai mare ca la martor (fig. 7 *d* şi *c*), în detrimentul componentei cu greutate moleculară mai mare.

Asemănarea dintre fragmentele IgM_s şi IgM_p reiese din datele cantitative din tabela 1 (fig. 7 *c* şi *f*).

Rezultatele noastre sugerează faptul că MEA cu papainăacţionează ca activator al acesteia, mai degrabă decît ca agent de reducere, dînd fragmente de tip IgM_p şi nu de tip IgM_s.

Îndepărtarea glucidelor conduce la o hidroliză mai accentuată a IgM în fragmente de tip IgM_p sugerînd implicarea lanţurilor oligozaharidice de pe fragmentul Fc în reglarea procesului de scindare a IgM, în condiţiile întrebuinţate.

CONCLUZII

În condiţii foarte blînde, ca reducerea cu concentraţii foarte slabe de reducător sau proteoliză foarte scurtă, comportarea IgM este deosebită, după cum este nativă sau parţial deglucidizată.

Reiese că structura cuaternară este dependentă de prezenţa glucidelor.

Îndepărtarea parţială a glucidelor conduce la o hidroliză mai accentuată a IgM sugerînd implicarea lanţurilor oligozaharidice în reglarea procesului de scindare a IgM.

Prezentat la redacţie
la 23 mai 1978

Institutul de Ştiinţe Biologice
spl. Independenţei 296
77748 Bucureşti, România

THE ROLE OF CARBOHYDRATE MOIETY IN THE INTRACELLULAR DEGRADATION OF GLYCOPROTEINS. VII. PAPAIN CONTROLED PROTEOLYSIS OF IgM NATIVE AND TREATED WITH A GLYCOSIDASES MIXTURE FROM *DIPLOCCOCUS PNEUMONIAE*

SUMMARY

The carbohydrates were partially removed from IgM by using a glycosidases mixture from *Diplococcus pneumoniae*; it was subsequently subjected to papain controled hydrolysis in the presence of $2 \cdot 10^{-3}$M mercaptoethylamine (MEA), comparatively with native IgM and IgM treated with MEA only. The IgM behaviour was followed by double diffusion, immunoelectrophoresis, disc electrophoresis in polyacrylamide gel and by cross immunoelectrophoresis. IgM_p and IgM_s respectively were obtained, along with another component with higher molecular weight. The quantitative data show the involvement of the oligosaccharide chains in the regulation of the cleavage process of IgM, as their partial removal leads to a more intense hydrolysis of IgM.

BIBLIOGRAFIE

1. H. Metzger, Adv. Immunol., **12**, 57 (1970).
2. J. M. Davie, C. K. Osterland, J. Exp. Med., **128**, 699 (1968).
3. S. Hickman, R. Kornfeld, C. K. Osterland, ST. Kornfeld, J. Biol. Chem., **247**, 2156 (1972).
4. W. Niedermeyer, R. E. Schrohenloher, M. Hurst, J. Immunol., **108**, 346 (1972).
5. F. W. Putnam, G. Florent, C. Paul, T. Shinoda, A. Shimizu, Science, **182**, 287 (1973).
6. M. M. Hurst, W. Niedermeyer, J. Zikan, J. C. Bennett, J. Immunol., **110**, 840 (1973).
7. F. Melchers, Biochemistry, **11**, 2204 (1972).
8. E. Kownatzki, Immunol., Commun., **2**, 105 (1973).
9. D. Beale, Biochim. biophys. acta, **351**, 13 (1974).
10. E. Della Corte, R. M. E. Parkhouse, Biochem. J., **136**, 589 (1973).
11. E. Della Corte, R. M. E. Parkhouse, Biochem. J., **136**, 597 (1973).
12. R. M. E. Parkhouse, E. Della Corte, Biochem. J., **136**, 607 (1973).
13. D. Beale, N. Buttres, Biochim. biophys. acta, **257**, 372 (1972).
14. T. S. Anantha Samy, Arch. biochem. biophys., **121**, 703 (1967).
15. R. C. Beesley, J. G. Forte, Biochim. biophys. acta, **356**, 144 (1974).
16. R. C. Beesley, J. G. Forte, Biochim. biophys. acta, **307**, 372 (1973).
17. N. N. Aronson, Ch. De Duve, J. biol. chem., **243**, 4564 (1968).
18. A. G. Morell, G. Gregoriadis, I. H. Scheinberg, J. Hickman, G. Ashwell, J. biol. chem., **246**, 1461 (1971).
19. G. Gregoriadis, D. Putnam, L. Louis, D. Neerunjun, Biochem. J., **140**, 323 (1974).
20. E. Ganea, C. Motaş, Rev. roum. biochim. **12**, 29 (1975).
21. L. Buzilă, C. Motaş, Rev. roum. biochim., sub tipar.
22. L. Buzilă, F. Mihalcu, C. Motaş, St. cerc. biochim., **21**, 789 (1978).
23. N. Koide, T. Muramatzu, J. biol. chem., **249**, 4897 (1974).
24. F. P. Inman, S. R. Hazen, J. biol. chem., **243**, 5598 (1968).
25. J. C. Bennett, Biochemistry, **7**, 3340 (1968).
26. R. C. Hughes, R. W. Jeanloz, Biochemistry, **3**, 1535 (1964).
27. A. P. Flechter, R. D. Marshall, A. Neuverger, Biochem. J., **87**, 265 (1962).
28. N. Koide, M. Nose, T. Muramatzu, Biochim. biophys. res. commun., **75**, 838 (1977).
29. A. L. Tarentino, T. H. Plummer, F. Maley, J. biol. chem., **249**, 818 (1974).
30. M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith, Anal. chem., **28**, 350 (1956).
31. B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404 (1964).
32. O. Ganrot, Scand. J. Clin. Lab. Invest., Suppl., **124**, 39 (1972).
33. J. Radl, F. Klein, P. Van Der Berg, A. M. De Bruyn, W. Hijmans, Immunology, **20**, 843 (1971).
34. D. Beale, A. Feinstein, Biochem. J., **112**, 187 (1969).

INFLUENŢA CONDIŢIILOR DE CULTIVARE ASUPRA ACTIVITĂŢII DN-*AZICE* ÎN SUŞE SĂLBATICE ŞI MUTANŢI DE *ASPERGILLUS NIGER*

CONSTANŢA MUŞOLAN, S. VASU, IOANA GOMOIU

Rezumat. Suşa sălbatică G—1 de *A. niger* şi cîţiva mutanţi selecţionaţi în 1976 prin gamma iradierea sporilor au fost testaţi din punctul de vedere al activităţii DN-azice şi al sintezei de biomasă. Testele s-au făcut atît pe culturi statice cît şi agitate, în vîrstă de 2, 3 şi 6 zile, în diferite condiţii experimentale. Sinteza de biomasă depinde de numărul şi concentraţia sporilor, de condiţiile de aerare, nutriţie, de tipul culturii (de suprafaţă sau agitată). Diferenţele între sinteza de biomasă în mutanţi şi cea din suşa sălbatică erau evidente în culturile agitate, dar nu şi în cele statice. De asemenea, diferenţele între activităţile DN-azice în mutanţi şi cele din suşa sălbatică au fost constatate în culturile agitate, dar nu şi în cele statice. Date asemănătoare s-au constatat şi pentru suşa sălbatică *A. niger* ICA-34 şi speciile *A. oryzae* şi *A. terricola*.

Într-o lucrare anterioară am prezentat activităţile DN-azice în *Aspergillus niger*, suşa sălbatică G—1 şi cîţiva mutanţi obţinuţi prin gamma iradierea sporilor. În condiţiile de cultivare folosite în lucrarea menţionată — culturi agitate, însămînţate cu 4×10^7 spori /150 ml mediu Raulin — am constatat că suşa sălbatică în vîrstă de 3 zile are o slabă activitate DN-azică la pH 7,8, în timp ce unii mutanţi (16, 52, 59, 61) prezentau o activitate enzimatică apreciabilă (1).

Întrucît mutanţii au fost izolaţi în 1976 s-a pus problema retestării activităţii DN-azice, cu scopul de a selecţiona acei mutanţi care şi-au conservat în timp caracterul de bun producător de DN-ază. Pentru aceasta, am obţinut culturi atît în condiţii similare celor din lucrarea (1), cît şi în condiţii diferite, în ceea ce priveşte numărul de spori folosiţi la însămînţare, agitarea, vîrsta culturii.

În cele de mai jos prezentăm activitatea DN-azică intracelulară în *Aspergillus niger*, suşa sălbatică G—1 şi cîţiva mutanţi, în vîrstă de 2, 3 şi 6 zile, în culturi agitate şi statice, obţinute prin însămînţarea cu un număr variabil de spori.

De asemenea prezentăm cîteva date privind activitatea DN-azică în *A. oryzae* şi *A. terricola*, în condiţiile de cultivare menţionate mai sus.

MATERIAL ŞI METODE

Suşa sălbatică G—1 şi mutanţii 12, 13, 15, 16, 52, 59, 61, 75 s-au crescut pe mediu Raulin, în culturi statice sau agitate, însămînţate cu un număr diferit de spori : culturi statice : 1×10^6 spori/50 ml mediu (exp. I), respectiv 3×10^6 spori /150 ml mediu (exp. II) ; culturi agitate : 6×10^6 spori/150 ml mediu (exp. I), respectiv 3×10^6 spori/150 ml mediu (exp. II). Miceliile

în vîrstă de 2, 3 și 6 zile s-au recoltat, s-au spălat repetat cu apă, după care s-au tamponat cu hîrtie de filtru. S-a determinat greutatea umedă a acestor micelii.

Miceliile s-au mojarat cu azot lichid și apă (1 g miceliu/5 ml H_2O), s-au extras două ore la rece, după care s-au înghețat, ca și lichidele de cultură corespunzătoare, filtrate. În momentul testărilor, probele s-au dezghețat, s-au centrifugat la 12000 rpm, 20 min. Supernatantele s-au folosit drept preparate brute de DN-ază intracelulară (cele provenite din miceliu), și extracelulară (cele provenite din lichidul de cultură).

Difuzia radială s-a făcut în gel de agaroză 1%, ADN înalt molecular 0,02% (experiența I), respectiv ADN degradat 0,05% (experiența II), $MgCl_2$ 5mM în tampon Tris--HCl, 0,2M, pH 7,8, respectiv acid acetic-acetat de sodiu 0,2M, pH 5,4 (2) (3) (4) (5). După o incubare de 18 ore la 37°C în camera umedă, plăcile s-au fixat două ore cu acid acetic-etanol-apă (5 :20 :75) și s-au colorat 10 min cu albastru de toluidină 0,2% în acid acetic 2%. Final, plăcile s-au spălat cu acid acetic 2% și apă, s-au uscat cu hîrtie de filtru; după uscare s-au măsurat diametrele zonelor de difuzie.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Greutățile umede ale miceliilor de *A. niger* în vîrstă de 2, 3 și 6 zile, în culturi statice și agitate, sînt date în tabela 1.

Tabela 1

Greutatea umedă (g) a miceliilor de A. niger (sușe sălbatice și mutante) în vîrstă de 2, 3 și 6 zile, în culturi staționare și agitate

	Culturi staționare			Culturi agitate		
	2 zile	3 zile	6 zile	2 zile	3 zile	6 zile
Experiența 1						
Culturi staționare: 1×10^6 spori în 50 ml mediu Culturi agitate: 6×10^6 spori în 150 ml mediu						
ICA—34	—	0,780	4,145	—	2,676	11,996
G—1	—	1,035	4,820	—	3,695	8,250
12	—	0,990	5,610	—	1,375	8,660
13	—	0,660	3,655	—	1,762	9,965
15	—	1,040	5,146	—	1,720	11,975
16	—	1,170	5,335	—	2,851	6,560
52	—	1,725	4,300	—	3,560	12,020
59	—	1,095	3,795	—	1,492	10,970
61	—	0,992	3,715	—	2,825	9,670
75	—	0,800	3,545	—	1,505	8,290
Experiența 2						
Culturi staționare: 3×10^6 spori în 150 ml mediu Culturi agitate: 3×10^6 spori în 150 ml mediu						
ICA—34	0,820	6,830	16,150	0,151	0,770	2,430
G—1	0,940	6,880	15,570	0,261	0,680	2,870
13	0,505	5,210	16,160	0,150	1,250	13,170
16	1,320	8,470	15,435	0,144	1,960	15,000
52	1,230	7,350	16,365	0,235	1,165	2,510
59	0,885	6,120	19,135	0,690	1,740	16,990
61	0,891	5,300	18,960	0,254	1,610	3,930

Întrucît experiențele s-au realizat în condiții diferite, am făcut un calcul ipotetic pentru greutățile umede, presupunînd că toate însămînțările s-au făcut cu 3×10^6 spori în 150 ml mediu. Valorile calculate pentru

aceste greutăți sînt date în tabela 2. Rapoartele dintre valorile calculate din tabela 2 și valorile experimentale din tabela 1 sînt date în tabela 3.

Tabela 2

Valorile calculate pentru greutățile umede din tabela 1, presupunînd că însămînțările au fost făcute cu 3×10^6 spori în 150 ml mediu

	Culturi staționare			Culturi agitate		
	2 zile	3 zile	6 zile	2 zile	3 zile	6 zile
			Experiența 1			
ICA—34	—	2,340	12,435	—	1,338	5,998
G—1	—	3,105	14,460	—	1,848	4,125
12	—	2,970	16,830	—	0,688	4,330
13	—	1,980	10,965	—	0,881	4,983
15	—	3,120	15,438	—	0,860	5,988
16	—	3,510	16,005	—	1,426	3,280
52	—	5,175	12,900	—	1,780	6,010
59	—	3,285	11,385	—	0.746	5,485
61	—	2,976	11,145	—	1,413	4,835
75	—	2,400	10,635	—	0,753	4,145
			Experiența 2			
ICA—34	0,820	6,830	16,150	0,151	0,770	2,430
G—1	0,940	6,880	15,570	0,261	0,680	2,870
13	0,505	5,210	16,160	0,150	1,250	13,170
16	1,320	8,470	15,435	0,144	1,960	15,000
52	1,230	7,350	16,365	0,235	1,165	2,510
59	0,885	6,120	19,135	0,690	1,740	16,990
61	0,891	5,300	18,960	0,254	1,610	3,930

Tabela 3

Raportul greutăților umede calculate ale micelilor omologe din culturi staționare și culturi agitate, precum și a celor din experiența 1 și experiența 2

	Staționar/agitat						Exp. 2/Exp. 1			
	Exp. 1			Exp. 2			Staționar		Agitat	
	2 zile	3 zile	6 zile	2 zile	3 zile	6 zile	3 zile	6 zile	3 zile	6 zile
ICA—34	—	1,75	2,07	5,43	8,87	6,65	2,92	1,30	0,58	0,40
G—1	—	1,68	3,50	3,60	10,11	5,43	2,22	1,08	0,37	0,70
12	—	4,32	3,89	—	—	—	—	—	—	—
13	—	2,25	2,20	3,37	4,17	1,23	2,63	1,47	1,42	2,64
15	—	3,63	2,58	—	—	—	—	—	—	—
16	—	2,46	4,88	9,17	4,32	1,03	2,41	0,96	1,37	4,57
52	—	2,90	2,15	5,23	6,28	6,52	1,42	1,27	0,65	0,42
59	—	4,40	2,08	1,28	3,52	1,13	1,86	1,68	2,33	3,10
61	—	2,10	2,31	3,51	3,29	4,82	1,78	1,70	1,14	0,95
75	—	3,19	2,57	—	—	—	—	—	—	—

Comparînd datele din cele două experiențe, constatăm că în experiența 2, culturile statice s-au dezvoltat mult mai bine — în special în primele trei zile — decît cele din experiența 1. Unul din motive ar putea fi diferența între grosimea stratului de mediu, respectiv a suprafeței de

contact cu aerul, întrucît în experiența 1, culturile au fost crescute în Erlenmeyere de 100 ml, conținînd cîte 50 ml mediu, în timp ce în experiența 2 s-au folosit Erlenmeyere de 750 ml, conținînd cîte 150 ml mediu (concentrația sporilor în cele două experiențe a fost aceeași : 1×10^6 spori în 50 ml — exp. 1 ; 3×10^6 spori în 150 ml — exp. 2).

Pe de altă parte, în experiența 2, culturile agitate ale sușelor sălbatice, ca și ale mutantului 52 s-au dezvoltat mai slab decît în experiența 1 ; totuși, unii mutanți (13, 16, 59) — în special cei în vîrstă de 6 zile — au crescut mai bine în experiența 2 decît în experiența 1. Una din explicații ar putea fi diferența între concentrația sporilor în cele două experiențe (6×10^6 în 150 ml — experiența 1 ; 3×10^6 în 150 ml — experiența 2). S-ar putea ca pentru sușele sălbatice și mutantul 52, concentrația sporilor în experiența 2 să fie sub valoarea optimă, în timp ce pentru mutanții 13, 16, 59, concentrația sporilor în experiența 1 să fie prea mare, inhibînd dezvoltarea normală a miceliului. Cele de mai sus sugerează că dezvoltarea miceliilor depinde de numărul de spori, de concentrația acestora, dependența nefiind direct proporțională ; pe de altă parte, această dependență pare să fie specifică fiecărei sușe sau mutant. Dealtfel, corelația neliniară și specifică dintre numărul de spori cu care se face însămînțarea și creșterea miceliului, este un fenomen cunoscut pentru fungul *Aspergillus* (6).

Pe lîngă cele de mai sus, dezvoltarea miceliilor depinde mult de condițiile de agitare. În ambele experiențe culturile statice au crescut mai bine decît cele agitate. Cele mai elocvente sînt rezultatele din experiența 2, îndeosebi probele în vîrstă de 3 zile, în care același, număr de spori (3×10^6), în același volum de mediu (150 ml) și același tip de vase (Erlenmeyere de 750 ml) au dus la sinteze de biomasă în culturi statice mult mai mari decît cele în culturi agitate.

Comparînd greutățile mutanților cu cele ale sușei sălbatice în culturi statice nu constatăm diferențe prea mari. În culturi agitate, în experiența 1, mutanții sînt mai slab dezvoltați decît sușa sălbatică, în special la vîrsta de 3 zile. În experiența 2 rezultatele sînt diferite, dar trebuie să ținem seama de faptul că sușa sălbatică s-a dezvoltat foarte slab în această experiență.

Rezultatele de anul acesta (experiența 1, culturi agitate de 3 zile, însămînțate cu 6×10^6 spori/150 ml mediu) confirmă datele de anul trecut cînd, în condiții similare (cu excepția numărului de spori pentru însămînțare — 40×10^6) am găsit de asemenea o dezvoltare mai slabă a mutanților, în comparație cu sușa sălbatică. Aceste diferențe în sinteza de biomasă pot reflecta anumite tulburări ale metabolismului general în mutanți, ce pot implica și metabolismul acizilor nucleici, respectiv DN-azele (1). Dorim să subliniem că diferențele apar în culturi agitate, dar ele nu sînt evidente în culturile statice.

Activitățile DN-azelor în omogenatele și lichidele de cultură ale sușelor sălbatice și mutanților de *A. niger*, în culturi statice și agitate în vîrstă de 3 și 6 zile sînt prezentate în figurile 1—4. Valorile diametrelor zonelor de difuzie ale DN-azelor din aceste figuri sînt date în tabela 4.

După cum se vede, există o diferență netă între activitățile DN-azelor în culturi statice, respectiv în culturi agitate.

Fig. 1—4. Difuzia radială a DN-azelor din suşe sălbatice şi mutanţi de *A. niger* (experienţa 1).
Substrat: ADN înalt molecular.
Probele au fost plasate în godeuri conform schemei de mai jos. (0: omogenat; l. c.: lichid de cultură).

	0		l.c.	0		l.c.	0		l.c.	0		l.c.	0		l.c.
		ICA			G—1			12			13			15	
Culturi	×		×	×		×	×		×	×		×	×		×
statice		16			52			59			61			75	
	×		×	×		×	×		×	×		×	×		×
		ICA			G—1			12			13			15	
Culturi	×		×	×		×	×		×	×		×	×		×
agitate		16			52			59			61			75	
	×		×	×		×	×		×	×		×	×		×

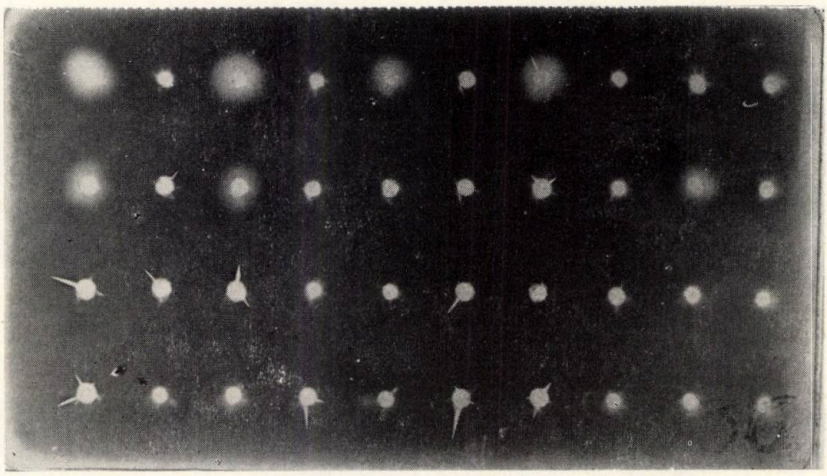


Fig. 1. — Culturi de 3 zile, pH optim 5,4

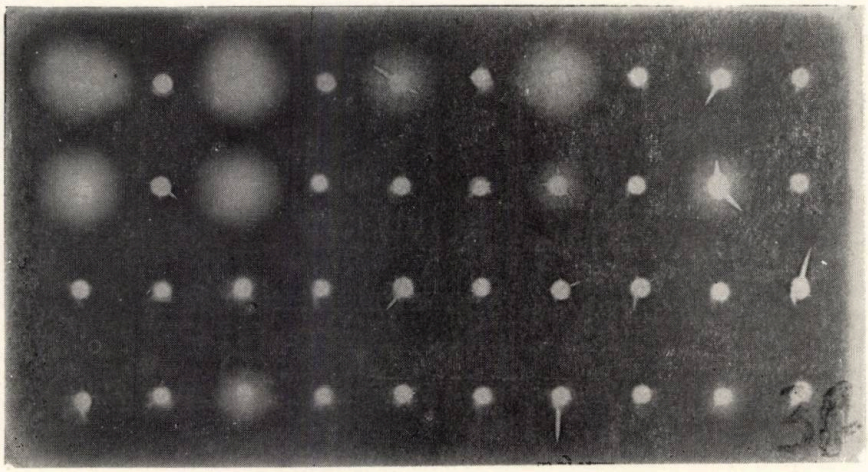


Fig. 2. — Culturi de 3 zile, pH optim 7,8

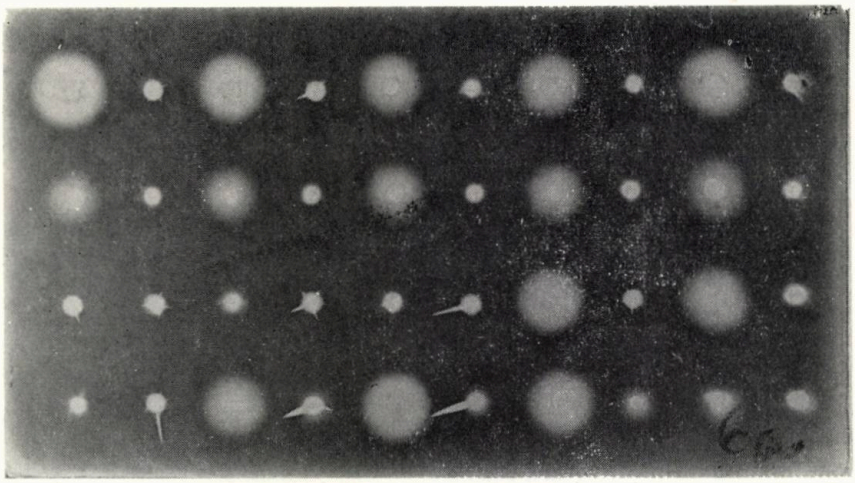


Fig. 3. — Culturi de 6 zile, pH optim 5,4

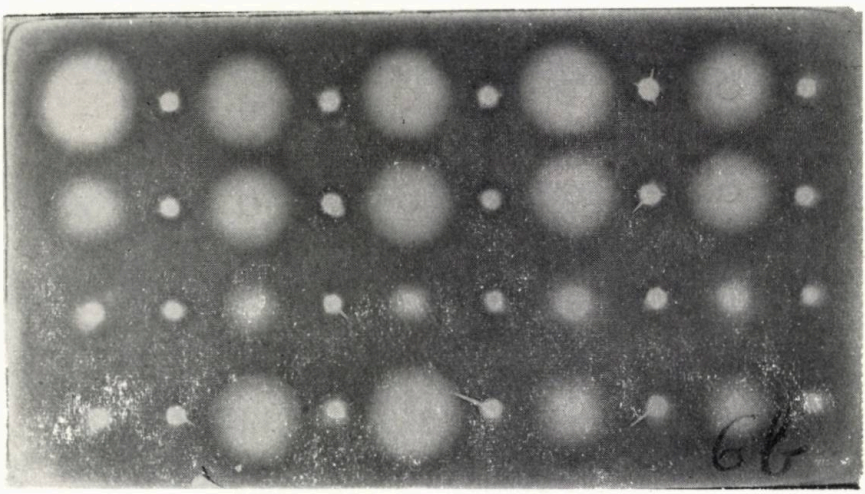


Fig. 4. — Culturi de 6 zile, pH optim 7,8

Fig. 5—8. Difuzia radială a DN-azelor din suşele sălbatice şi mutanţii de *A. niger*, precum şi din *A. oryzae* şi *A. terricola* (exp. 2).

Substrat: ADN degradat; Enzima: omogenat total de miceliu.
Probele au fost plasate în godeuri conform schemei de mai jos.

Vîrsta culturii	ICA	G_1	13	16	52	59	61	A. oryzae	A. terricola
2 zile	×	×	×	×	×	×	×	×	×
3 zile	×	×	×	×	×	×	×	×	×
6 zile	×	×	×	×	×	×	×	×	×

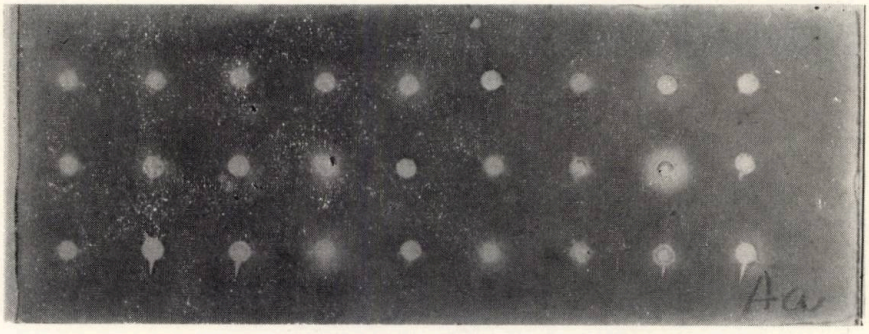


Fig. 5. — Culturi agitate, pH optim 5,4

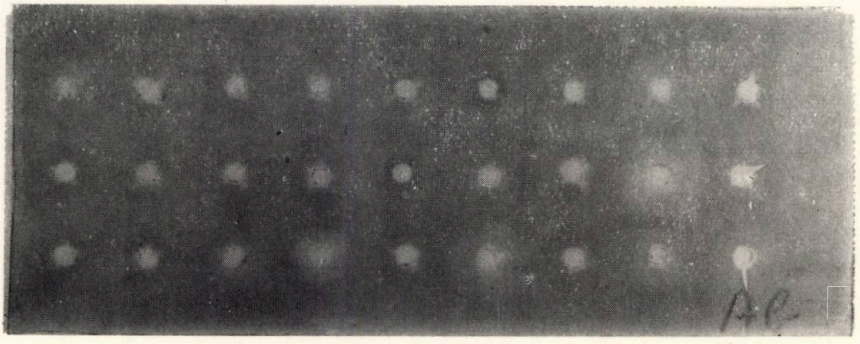


Fig. 6. — Culturi agitate, pH optim 7,8

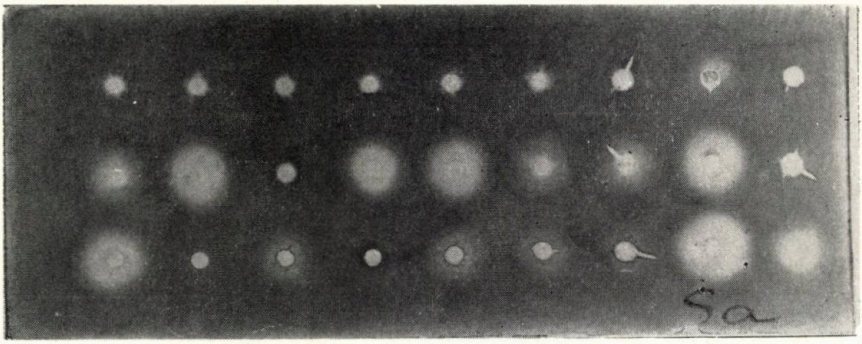


Fig. 7. — Culturi statice, pH optim 5,4

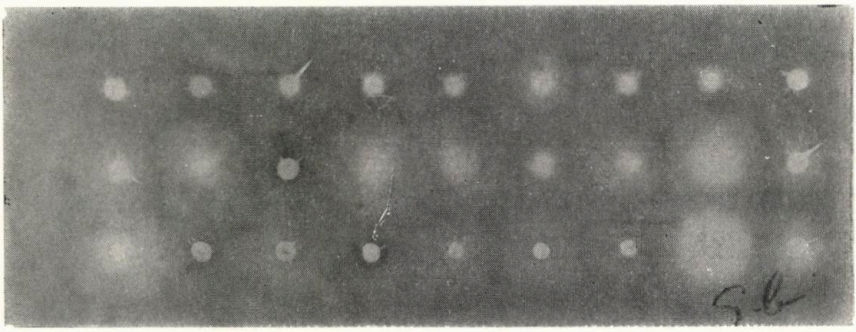


Fig. 8. — Culturi statice, pH optim 7,8

În culturi agitate, susa ICA-34 nu prezintă practic activitate DN-azică; susa G—1, din care au fost obținuți mutanții, prezintă o activitate

Tabela 4

Diametrele zonelor de difuzie (mm) ale DN-azelor intracelulare din sușe sălbatice și mutante de A. niger, în vîrstă de 3 și 6 zile, în culturi staționare și agitate

Proba	Culturi staționare				Culturi agitate			
	3 zile		6 zile		3 zile		6 zile	
	pH 5,4 (fig. 1)	pH 7,8 (fig.2)	pH 5,4 (fig. 3)	pH 7,8 (fig. 4)	pH 5,4 (fig. 1)	pH 7,8 (fig. 2)	pH 5,4 (fig. 3)	pH 7,8 (fig. 4)
ICA	10,0	18,0	14,5	20,0	—	—	—	—
G—1	10,0	18,0	13,0	18,5	—	—	—	8,0
12	9,0	13,0	10,0	18,0	—	—	—	5,0
13	10,0	17,0	11,0	18,0	—	—	13,0	8,0
15	—	—	13,0	14,0	—	—	12,5	6,0
16	8,5	16,0	9,0	16,0	—	—	—	—
52	7,5	16,0	10,0	17,0	—	9,5	12,0	17,0
59	—	—	10,0	17,0	—	—	14,0	18,5
61	—	10,5	10,0	17,0	—	7,0	13,0	12,0
75	6,0	11,5	10,0	17,0	—	—	—	11,0

slabă, doar la pH 7,8, în cultura de 6 zile. Dealtfel, în culturile de 3 zile, doar doi mutanți sînt activi (52 și 61), ceilalți neavînd activitate DN-azică. Testați la vîrste mai mari (6 zile), cei mai mulți mutanți prezintă activități DN-azice mai mari decît ale susei sălbatice (maximum la mutanții 52, 61, 59), singurul inactiv fiind mutantul 16.

În culturi staționare susele sălbatice înseși prezintă activități DN-azice considerabile, la ambele pH-uri optime și la ambele vîrste ale miceliilor (3 și 6 zile), deci nu se mai constată diferențele semnalate în culturi agitate.

În experiența *2* am urmărit activitatea DN-azică în *A. niger* (susele sălbatice ICA-34 și G—1 și mutanții 13, 16, 52, 59, 61) și *A. oryzae* și *A. terricola*, în vîrstă de 2, 3 și 6 zile, față de ADN degradat (fig. 5—8).

Ca și în experiența *1*, culturile statice din experiența *2* nu prezentau diferențe ale activității enzimatice între susa sălbatică și mutanți.

În culturi agitate susele sălbatice nu aveau activități DN-azice, confirmînd rezultatele din experiența *1*; pe de altă parte, în experiența *2* (substrat-ADN degradat) majoritatea mutanților (cu excepția mutantului 16) sînt mai puțin activi decît în experiența *1* (substrat-ADN înalt molecular).

Comparînd rezultatele de anul acesta (experiența *1*, culturi agitate de 3 zile) cu cele de anul trecut, obținute în condiții similare, constatăm că mutanții selecționați în 1976 ca avînd cele mai mari activități DN-azice (52 și 61) sînt și în aceste experiențe cei mai activi. În schimb, mutanții 16 și 59, cu activități apreciabile în momentul selecționării nu mai sînt activi anul acesta. Dacă prelungim perioada de observație de la 3 zile la 6 zile, activitatea DN-azică a mutanților apare foarte evidentă, în comparație cu cea a susei sălbatice.

CONCLUZII

Condițiile de cultivare influențează considerabil metabolismul unor specii, sușe și mutanți de *Aspergillus*, atît din punctul de vedere al sintezei de biomasă, cît și al activității DN-azice.

Sinteza de biomasă depinde de numărul și concentrația sporilor cu care se face însămînțarea, condițiile de nutriție (grosimea stratului de mediu, suprafața mediului), aerare, agitare.

În culturi agitate este evidentă o dezvoltare mai slabă a mutanților în comparație cu sușa sălbatică; în culturi statice — mutanții se dezvoltă relativ asemănător cu sușa sălbatică.

Activitățile DN-azice în culturi statice sînt mai mari decît în culturi agitate.

În culturi agitate mutanții prezintă activități DN-azice mai mari decît sușa sălbatică. În culturi statice, sușa sălbatică are activități DN-azice apreciabile, asemănătoare celor din mutanți, deci nu se mai relevă diferențele constatate la culturile agitate.

Rezultatele obținute anul acesta, în culturi agitate, confirmă, în general, rezultatele anterioare, evidențiind conservarea caracterului de bun producător de DN-ază la cîțiva mutanți selecționați în 1976. În culturi statice, însă, rezultatele nu relevă conservarea caracterelor dobîndite prin mutație, nici la nivelul sintezei de biomasă, nici la cel al activităților DN-azice.

Prezentat la redacție
la 11 decembrie, 1978

Institutul de Științe Biologice
București
Splaiul Independenței 296
77748 București, România

THE INFLUENCE OF CULTIVATION CONDITIONS ON THE DN-ase ACTIVITY IN WILD STRAINS AND MUTANTS OF *ASPERGILLUS NIGER*

SUMMARY

A. niger wild strain G—1 and several mutants selected in 1977 by gamma irradiation of the spores were tested for their DN-ase activity, and biomass synthesis. The tests were performed for both submerged and surface cultures, 2, 3 and 6 days old, in various experimental conditions. Biomass synthesis depends on the number and concentration of the spores, the conditions of nutrition, aeration, type of culture (submerged, surface). The differences between biomass synthesis in mutants and that in wild strain were obvious in submerged cultures, but they were not evident in surface ones. Similarly, differences between DN-ase activities in mutants and those in wild strain were found in submerged cultures, but not in surface ones. DN-ase activities were higher in surface

cultures than in submerged ones. Similar facts were found for the wild strain ICA-34 of *A. niger*, as well as for the species *A. oryzae* and *A. terricola*.

BIBLIOGRAFIE

1. S. Vasu, C. Mușolan, L. Botoșeneanu, V. Lazăr, Rev. Roum. Biochim., **14**, 133 (1977).
2. V. B. Schill, G. Schummacher, Anal Biochem., **46**, 502 (1972).
3. S. Vasu, S. A. Hulea, S. Rădulescu, Rev. Roum. Biochim., **8**, 351 (1971).
4. S. Nagasaki, J. Gen. Appl. Microbiol., **12**, 267 (1966).
5. C. Mușolan, S. Vasu, St. Cerc. Biochim., **20**, 209 (1977).
6. S. Vasu, Teză de doctorat, București, 1973.

CONTRIBUŢII LA BIOSINTEZA CAROTENOIDELOR VII. BIOSINTEZA CAROTENOIDELOR DIN *AESCULUS PARVIFLORA WALT*

GAVRIL NEAMŢU, TIBERIU LÁSZLÓ, CORINA BILĂUŞ

Rezumat. — S-au cercetat pigmenţii carotenoidici din frunze în diferite faze de creştere, din muguri florali în diferite stadii de dezvoltare şi din flori de *Aesculus parviflora Walt.*

Conţinutul pigmenţilor carotenoidici variază semnificativ în timpul creşterii şi îmbătrînirii frunzelor şi a mugurilor florali.

Dintre elementele florale anterele cu polen au conţinutul cel mai ridicat în pigmenţi carotenoidici, conţinînd predominant ceto-hidroxi-carotenoide cu structură pentaciclică, de tipul capsantinei. Pigmenţii principali sînt capsantina, capsontona, capsorubina, zeaxantina şi β-carotina, alături de care se găsesc în cantitate mică criptoxantina, luteina, criptocapsina, criptocapsona şi capsantinmonoepoxid.

Principalele ceto-hidroxi-carotenoide din anterele cu polen se formează iniţial în ţesuturile meristematice din mugurii florali.

Cunoaşterea biosintezei pigmenţilor carotenoidici la plante constituie o problemă de mare însemnătate teoretică şi practică, fapt pentru care numeroşi cercetători caută să-şi aducă contribuţia la cunoaşterea mecanismului biosintezei acestor pigmenţi, atît de larg răspîndiţi în natură (1—5).

Dintre plantele superioare speciile genului *Aesculus* se caracterizează printr-un conţinut ridicat de ceto-hidroxi-carotenoide cu structură pentaciclică în anterele cu polen, fapt ce ne-a determinat să cercetăm conţinutul şi felul pigmenţilor carotenoidici foliari şi florali din unele specii ale acestui gen (6—8).

În această lucrare se prezintă dinamica conţinutului pigmenţilor carotenoidici din frunze în diferite faze de creştere, din muguri florali în diferite stadii de dezvoltare şi din flori de *Aesculus parviflora Walt.*, specie necercetată pînă în prezent sub acest aspect.

MATERIAL ŞI METODE

Pentru determinarea pigmenţilor carotenoidici s-a folosit material proaspăt şi conservat (frunze, muguri florali şi flori), recoltat în anii 1976 şi 1977 de pe arbori de *A. parviflora Walt* din Grădina botanică a Universităţii Babeş-Bolyai din Cluj-Napoca. Frunzele după recoltare s-au uscat la umbră şi s-au păstrat în saci de hîrtie parafinată, la temperatura de 18°C. Mugurii florali şi polenul s-au conservat în eter de petrol, în vase ermetic închise.

Extragerea pigmenţilor carotenoidici s-a făcut cu amestec de eter de petrol-acetonă-metanol, în raport de 6 : 3 : 1. Pentru separarea şi purificarea carotenoidelor s-a folosit în cea mai mare parte cromatografia pe coloană, utilizînd ca adsorbant amestec de oxid de magneziu şi nisip fin, în raport de 2 : 1 în greutate. Eluarea coloanelor cromatografice s-a făcut cu un

amestec de eter de petrol-benzen-acetonă, în raport de 7 : 2 : 1. Pentru cromatograme de amestec și pentru verificarea purității pigmenților s-a folosit cromatografia în strat subțire, utilizînd ca adsorbant oxid de magneziu și gips, în raport de 4 : 1, în volum, iar ca developant amestec de etanol-cloroform-eter de petrol 1 : 2 : 7.

Saponificarea pigmenților carotenoidici din polen s-a făcut cu o soluție etanolică de hidroxid de potasiu 8%, timp de 45 minute la 40°C. Valoarea conținutului pigmenților carotenoidici din tabele reprezintă media a patru determinări.

Extragerea, identificarea și determinarea pigmenților carotenoidici s-a făcut la fel ca în lucrările anterioare (6—8).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Conținutul pigmenților carotenoidici din frunze se prezintă în tabela 1.

Tabela 1

Conținutul pigmenților carotenoidici foliari din *Aesculus parviflora*, în μg/g material uscat

Carotenoide	Frunze de: 10 zile	30 zile	60 zile	90 zile	120 zile	150 zile	180 zile
a. *Carotenoide hidrocarburice*							
α-Carotina	2,6	3,4	4,9	5,2	3,8	2,3	1,5
β-Carotina	18,7	24,8	30,3	38,6	24,9	18,5	12,7
b. *Xantofile*							
β-Criptoxantina	4,8	5,0	5,8	6,1	4,7	2,4	1,8
Luteina	31,1	38,7	44,3	52,6	37,1	22,4	18,5
Zeaxantina	10,6	16,3	23,8	26,7	18,3	12,0	6,7
c. *Carotenoide epoxidice*							
Eloxantina	1,4	1,8	2,5	2,8	3,2	3,7	3,9
Violaxantina	2,5	3,1	3,4	3,9	4,2	4,6	4,8
Neoxantina	1,6	2,2	2,5	2,8	3,5	3,5	3,6
Total carotenoide	73,3	95,3	117,5	138,7	99,7	69,4	53,5

Din determinările efectuate reiese că frunzele de *A. parviflora*, recoltate la diferite intervale de timp de la apariția lor, au un conținut relativ ridicat în pigmenți carotenoidici. Odată cu creșterea și îmbătrînirea frunzelor se produc schimbări în ce privește conținutul și raportul dintre carotenoidele existente.

Conținutul carotenoidelor hidrocarburice și al xantofilelor crește concomitent cu creșterea frunzelor pînă ce acestea ajung la vîrsta de 90 de zile. După această perioadă conținutul acestor pigmenți scade treptat odată cu îmbătrînirea frunzelor.

Conținutul carotenoidelor epoxidice crește treptat cu creșterea, maturarea și îmbătrînirea frunzelor. Este posibil ca în timpul îmbătrînirii frunzelor o parte din carotenoidele hidrocarburice și din xantofile să se transforme prin reacții de oxidare în epoxicarotenoide. Degradarea carotenoidelor se face probabil prin intermediul carotenoidelor epoxidice.

Conținutul total al carotenoidelor scade odată cu îmbătrînirea frunzelor. Frunzele de 210 zile, recoltate în luna octombrie au avut un conținut total de carotenoide scăzut, de 32,6 μg/g. Frunzele veștejite și cele căzute de pe copac au un conținut total de carotenoide foarte mic, în medie de 4—7 μg/g.

Principalele carotenoide din frunze sînt luteina și β-carotina. Ca un aspect caracteristic apare prezența α-carotinei și a zeaxantinei în cantitate mai mare față de conținutul acestor pigmenți în frunzele altor specii de *Aesculus* (6—8).

Pe lîngă pigmenții carotenoidici în frunze se găsesc și pigmenți chinonici, de culoare galbenă, puternic reținuți pe coloana cromatografică (9).

Pentru a putea urmări procesul de biosinteză și corelația dintre carotenoidele foliare și cele florale, s-au determinat pigmenții carotenoidici din mugurii florali în diferite stadii de dezvoltare. Conținutul carotenoidelor din mugurii florali se prezintă în tabela 2.

Conținutul total al pigmenților carotenoidici din mugurii florali crește concomitent cu creșterea și dezvoltarea acestora.

În mugurii florali se găsesc atît carotenoide foliare cît și principalele carotenoide din polen. Apare de asemenea anteraxantina, care nu s-a

Tabela 2

Conținutul pigmenților carotenoidici din muguri foliari de *Aesculus parviflora*, în μg/g material uscat

	Muguri nedezvoltați de 4—5 zile	Muguri dezvoltați de 10—12 zile	Muguri înainte de înflorire de 18 — 20 zile
a. *Carotenoide hidrocarburice*			
α-Carotina	2,4	2,2	1,6
β-Carotina	22,6	20,4	18,5
b. *Xantofile*			
Criptoxantina	6,3	9,8	13,2
Luteina	40,6	36,5	30,8
Zeaxantina	8,9	14,7	16,3
c. *Carotenoide epoxidice*			
Eloxantina	1,5	0,8	urme
Anteraxantina	2,3	1,7	1,2
Violaxantina	3,6	2,4	1,8
Neoxantina	2,7	2,1	1,4
d. *Ceto-hidroxi-carotenoide*			
Criptocapsina	—	2,6	3,8
Capsantină	1,8	15,9	32,5
Capsantinmono-epoxid	1,3	1,8	2,7
Capsantonă	—	2,6	5,3
Capsorubină	0,7	1,9	13,7
Total carotenoide	94,7	115,4	142,8

găsit în frunze și nici în polen. Anteraxantina ar putea îndeplini rolul de pigment intermediar în procesul de transformare a carotenoidelor foliare în carotenoidele din polen cu structură pentaciclică de tipul capsantinei.

În timpul creșterii și dezvoltării mugurilor florali se produce o micșorare a carotenoidelor hidrocarburice, a xantofilelor și a carotenoidelor epoxidice și o creștere a ceto-hidroxi-carotenoidelor care se găsesc în polen (criptocapsină, capsantină, capsantinepoxid, capsantonă și capsorubină).

Prin faptul că pigmenții carotenoidici foliari scad concomitent cu formarea carotenoidelor din polen se poate presupune că o parte din carotenoidele foliare care se găsesc în muguri contribuie la formarea carotenoidelor florale. Transformarea carotenoidelor foliare în carotenoide florale cu inele pentaciclice se realizează prin izomerie retropinacolică (10—13).

Prin cromatografia în strat subțire s-au identificat carotenoidele din sepale, petale, filamente staminale și pistil.

În sepale s-au identificat β-carotina, criptoxantina, luteina, zeaxantina și violaxantina. Conținutul acestor pigmenți este apropiat celui din frunze.

În petale, care au o culoare roz-roșietică, s-au identificat β-carotina, luteina, zeaxantina, pigmenți chinonici și antociani.

Tabela 3

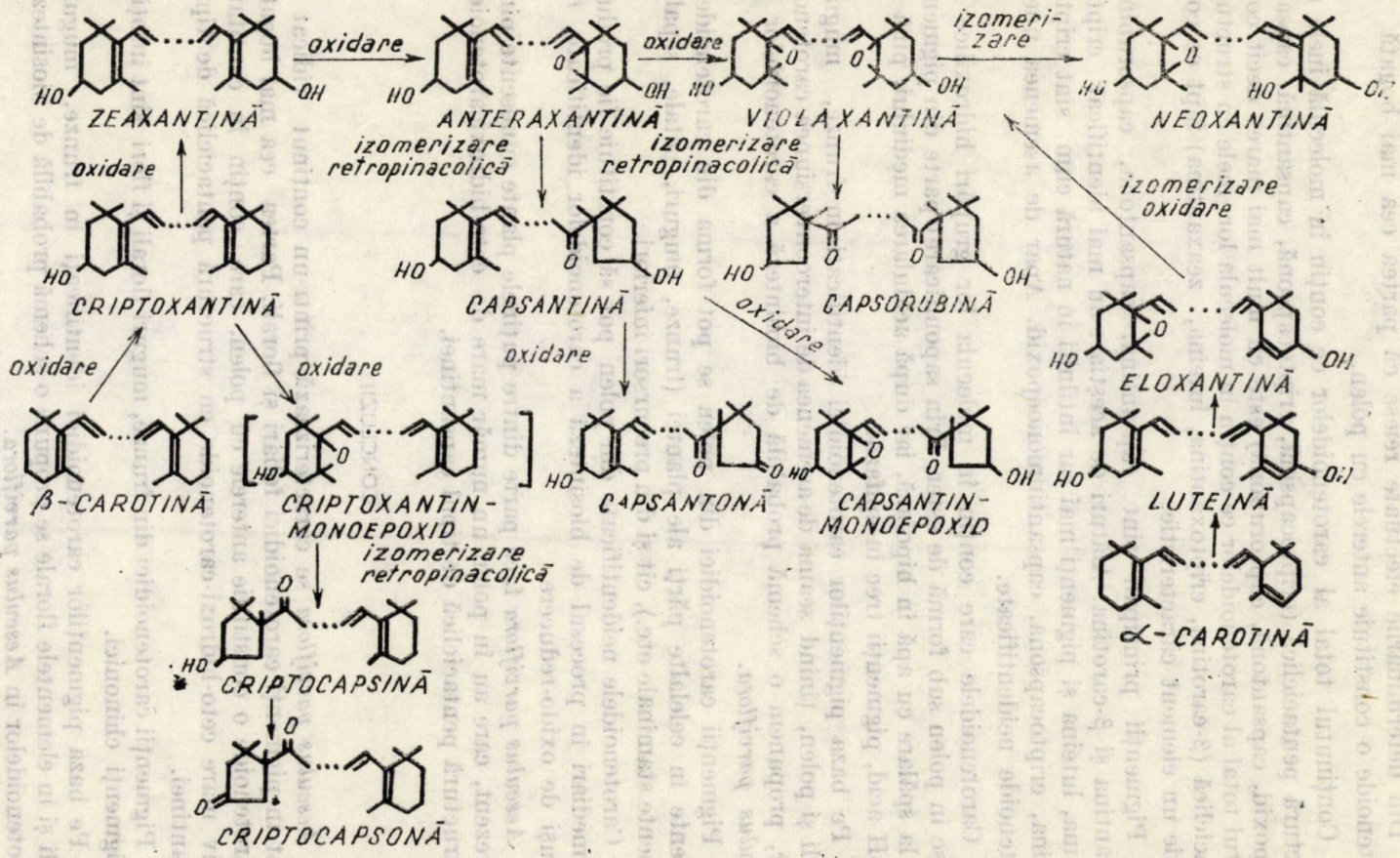
Cromatograma și conținutul carotenoidelor din antere cu polen de *Aesculus parviflora*

Lățimea zonei în cm	Culoarea	Carotenoide	Maxime de absorbție în eter de petrol, în nm	Cantitatea de pigment în μg/g material uscat
1,7	galben-cărămiziu	neidentificat	492, 456	16,7
0,6	violet-cărămiziu	neidentificat	496, 459	2,8
1,0	interzonă			
0,7	violet	capsorubină ester	507, 476, 451	19,6
0,5	interzonă			
1,2	violet-intens	capsantonă ester	505, 472, 446	22,4
0,6	roz-cărămiziu	capsantin epoxid ester	496, 468, 445	8,2
2,5	roșu-violaceu	capsantină ester	500, 468, 443	76,3
0,4	roșu-cărămiziu	neidentificat	498, 465, 477	4,8
0,3	portocaliu-violaceu	criptocapsonă	491, 477, 467	2,1
0,7	portocaliu-roșietic	criptocapsină ester	486, 472, 462	6,8
0,5	interzonă			
0,6	portocaliu	zeaxantină ester	478, 448	19,3
0,4	interzonă			
0,3	galben	luteină ester	474, 444	7,5
0,5	interzonă			
0,4	portocaliu	criptoxantină ester	478, 448	5,2
3,0	interzonă			
1,5	portocaliu	β-carotină	478, 447	15,4
	Total	carotenoide		207,1

În filamentele staminelor și în pistil s-au determinat β-carotina, luteina, pigmenți chinonici și principalele ceto-hidroxi-carotenoide din polen.

Conținutul pigmenților carotenoidici din anterele cu polen se prezintă în tabela 3.

SCHEMA I



SCHEMA BIOSINTEZEI PIGMENȚILOR CAROTENOIDICI DIN AESCULUS PARVIFLORA

Din determinările efectuate reiese că partea cea mai bogată în carotenoide o constituie anterele cu polen.

Conținutul total al carotenoidelor ce conțin în moleculă inele cu structură pentaciclică (criptocapsină, criptocapsonă, capsantină, capsantinepoxid, capsantonă, capsorubonă) este cu mult mai mare decît conținutul total al carotenoidelor ce conțin în molecula lor inele cu structură hexaciclică (β-carotina, criptoxantina, luteina, zeaxantina) fapt ce constituie un element caracteristic.

Pigmenții principali sînt capsantina, capsantona, capsorubina, zeaxantina și β-carotina. Alături de aceștia s-au mai identificat criptoxantina, luteina și pigmenți mai rar întîlniți în natură cum sînt criptocapsina, criptocapsona, capsantinmonoepoxid. Apar de asemenea unele carotenoide neidentificate.

Carotenoidele care conțin în molecula lor grupări hidroxilice se găsesc în polen sub formă de ester. Prin saponificare o parte din pigmenți trec la spălare cu apă în hipofază, iar după acidularea mediului, pînă la un pH acid, pigmenții trec în epifază.

Pe baza pigmenților carotenoidici identificați în frunze, muguri florali și polen, ținînd seama de asemenea de interconversiunea carotenoidelor, propunem o schemă probabilă de biosinteză a carotenoidelor în *Aesculus parviflora*.

Pigmenții carotenoidici din polen se pot forma din carotenoidele existente în celelalte părți ale plantei (frunze, muguri, petale, sepale, filamente staminale etc.), cît și din precursori inferiori.

Carotenoidele neidentificate din polen pot să constituie fie produși intermediari în procesul de biosinteză a carotenoidelor identificate, fie produși de oxido-reducere.

Aesculus parviflora face parte dintre puținele plante cunoscute pînă în prezent, care au în polen un număr mare de ceto-hidroxicarotenoide cu structură pentaciclică de tipul capsantinei.

CONCLUZII

Aesculus parviflora se caracterizează printr-un conținut ridicat și variat în pigmenți carotenoidici foliari și florali. Partea cea mai bogată în carotenoide o constituie anterele cu polen, care conțin în cantitate relativ mare ceto-hidroxi-carotenoide cu structură pentaciclică de tipul capsantinei.

Pigmenții carotenoidici din frunze, muguri florali și flori sînt însoțiți de pigmenți chinonici.

Pe baza pigmenților carotenoidici identificați în frunze, muguri florali și în elementele florale se propune o schemă probabilă de biosinteză a carotenoidelor în *Aesculus parviflora*.

MENȚIUNI

Lucrarea s-a efectuat în cadrul programului internațional comun de cercetări în domeniul pigmenților carotenoidici încheiat între Consiliul Național pentru Știință și Tehnologie (România) și National Science Foundation (Statele Unite ale Americii).

Prezentat la redacție
la 20 ianuarie 1978

Disciplina de chimie și biochimie vegetală
Institutului agronomic „Dr. Petru Groza"
din Cluj-Napoca

CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF THE BIOSYNTHESIS OF CAROTENOIDS VII. BIOSYNTHESIS OF CAROTENOIDS FROM *AESCULUS PARVIFLORA WALT*

SUMMARY

Investigations were carried out on the carotenoid pigments from leaves in various phases of growth, from floral buds in various stages of development and from flowers of *Aesculus parviflora* Walt.

The content of carotenoid pigments varied significantly during the growth and ageing of the leaves and of the floral buds.

Amongst the various floral elements, the highest content of carotenoid pigments was found in the pollen anthers, which contained predominantly keto-hydroxycarotenoids with pentacyclic structure of the capsanthin type. The principal pigments were capsanthin, capsanthon, capsorubin, zeaxanthin and β-carotene and just in small amounts there were also other pigments such as cryptoxanthin, lutein, cryptocapsin, cryptocapson and capsanthin monoepoxide.

The principal keto-hydroxycarotenoids from pollen anthers were initially formed in the meristematic tissues of the floral buds.

BIBLIOGRAFIE

1. C. Costes, *Recherches sur la biosynthèse et la métabolisme des caroténoides dans les feuilles*, Thèse de Doctorat en sciences I. N. R. A., Paris, 1964.
2. T. W. Goodwin, *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Academic Press, London, New York, Ed. I, 1965, p. 143.
3. O. Isler, *Carotenoids*, Birkhäuser Verlag Basel und Stuttgart, 1971, p. 29, 577.
4. E. C. Grob, R. Butler, Helv. Chim. Acta, **37**, 1908 (1954).
5. S. L. Jensen, Acta Chem. Scand., **15**, 1182 (1961).
6. G. Neamțu, Gh. Illyes, C. Bodea, St. cerc. biochim., **12**, 77 (1969).
7. G. Neamțu, C. Bodea, St. cerc. biochim., **16**, 35 (1973).
8. G. Neamțu, C. Bodea, St. cerc. biochim., **17**, 41 (1974).
9. A. R. Weleburn, F. W. Hemming, Biochem., J., **104**, 73 (1967).
10. M. S. Barber, L. M. Jackman, C. K. Warren, B.C.L. Weedon, J. Chem. Soc., 4019 (1961).
11. J. W. Faigle, H. Muller, W. von Philipshorn, P. Karrer, Helv. Chim. Acta, **47**, 471 (1 964)
12. L. Cholnoky, I. Szabolcs, Experientia, **16**, 483 (1960).
13. B. C. L. Weedon (citat din Carotenoids de O. Isler) Ed. Birkhäuser Verlag Basel und Stuttgart, 1971, p. 607.

MODIFICĂRI ALE SISTEMELOR PRODUCĂTOARE DE ENERGIE ÎN STĂRI DE ŞOC

RADU OLINESCU, GHEORGHE CIOBA, TOMA SAFTA, STELA NIŢĂ

Rezumat. În urma şocului hemoragic 50% produs la cîine apar modificări bifazice ai unor parametri biochimici. Modificările cele mai semnificative sînt: scăderea glicemiei, creşterea raportului lactat/piruvat şi a activităţii xantin oxidazei. Administrarea preventivă a unui inhibitor de xantin oxidază, alopurinol, permite prelungirea semnificativă a supravieţuirii şi a revenirii către valorile iniţiale ale parametrilor biochimici modificaţi de şoc. Se discută mecanismele implicate.

Dintre multiplele definiţii ale stării de şoc, cea descrisă de Schumer şi Erve (1) ca „o modificare neadecvată a circulaţiei sanguine producînd o irigare nesatisfăcătoare a ţesuturilor şi un metabolism celular alterat" pare a fi cea mai reprezentativă. Dintre modificările complexe, adeseori contradictorii ce se produc în şocuri de origini variate, singurul numitor comun este reprezentat de sistemele producătoare de energie. Supravieţuirea naturală, fără tratament, cît şi o conduită terapeutică adecvată depind de asigurarea hrănirii ţesuturilor cu oxigen şi substraturi necesare producerii energiei înmagazinată în ATP. Dealtfel, modificările cele mai profunde datorită şocului se produc în sistemele generatoare de energie şi afectarea lor duce la un deznodămînt fatal.

Desigur, există diferenţe mari între şocuri de origini diferite, dar sînt şi faze comune. Şocul hemoragic se întîlneşte frecvent, a fost studiat mai bine, aşa încît modificările sistemelor generatoare de energie vor fi studiate pe acest tip de şoc, în speranţa obţinerii unor concluzii cu aplicare practică, cît şi a unei mai clare caracterizări teoretice necesare unor noi posibilităţi terapeutice.

MATERIAL ŞI METODE

20 cîini, rasă comună, cîntărind între 9 şi 12 kg au fost anesteziaţi prin injecţie i. v. cu pentobarbital sodic (30 mg/kg). Prepararea animalului pentru experiment, introducerea cateterului în artera femurală şi sîngerarea pînă la 50% s-au efectuat după procedeele clasice (2). În timpul experimentului s-a măsurat continuu presiunea arterială şi s-au recoltat din oră în oră probe de sînge.

Determinările de acid lactic s-au efectuat după Chagnon et al. (3), acid piruvic după Friedman şi Hangen (4), glucoză după Ceriotti (5), acid uric după Folin (6), xantin oxidază după Clark şi Pratt (7), grupări sulfhidril libere plasmatice după Olinescu (8), ATP sanguin prin test Merck Nr. 15 979, sodiu şi potasiu prin flamfotometrie şi rezervă alcalină după procedeul clasic.

Iradierea cîinilor s-a efectuat cu o doză unică de 800 Rads radiaţii gamma Co^{60}, debit 450 R/minut.

Cîinii au fost împărţiţi în patru loturi a 5 animale: lot I şoc hemoragic, lot II şoc hemoragic + iradiat, lot III şoc hemoragic + alopurinol, lot IV şoc hemoragic + iradiat + alopurinol. Alopurinolul (40 mg/kg corp) s-a administrat mai ales preventiv cu 30 minute înaintea şocului.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În tabela 1 sînt prezentate principalele modificări biochimice urmărite în paralel cu evoluția șocului și a principalelor simptome clinico-biologice. Aceste modificări indică incomplet severitatea șocului, variațiile individuale, dar mai ales capacitatea de mobilizare a resurselor energetice. Se observă că în faza ireversibilă, lipsa de oxigen și acidoza modifică funcțiunile membranelor și ale transportului activ blocînd hrănirea celulelor cu glucide, aminoacizi etc. Datoria în oxigen ce se instalează în urma hipoxiei și a alterării schimburilor gazoase evoluează paralel cu

Tabloul principalelor modificări clinico-biologice și biochimice în cursul șocului hemoragic*)

Durată	Simptome clinico-biologice	Modificări biochimice	Observații
30 minute	Reducerea volumului sanguin Hipotensiune Tulburări circulatorii	Scăderea aportului de oxigen spre țesuturi Acidoză lactică Hiperglicemie	Fază dependentă de volumul hemoragiei
1—2 ore	Hipoxie tisulară Acidoză metabolică Tulburări în microcirculație Hipotermie Stimulare receptori respiratori Creștere ventilație respiratorie Stagnarea microcirculației	Hiperglicoliză Hipoglicemie Scădere HCO_3^- Scădere pCO_2 Scade pH sanguin Acidoză metabolică și respiratorie	Fază comună șocului de origini diferite Șoc reversibil
2—5 ore	Modificări morfologice Coagulare intravasculară	Modificări ale permeabilității membranelor Eliberarea hidrolazelor din lizozomi Modificări ale concentrațiilor hidroelectroliților	Decompensare Șoc ireversibil

*) Tabelul a fost întocmit pe baza datelor publicate (1, 2, 9, 12) și se referă la durata de timp după șocul hemoragic 30—50%.

acidoza metabolică și blocarea resurselor energetice. Acest din urmă efect, care delimitează șocul reversibil de cel ireversibil (1, 9, 10) nu este însă indicat prin determinările biochimice uzuale.

Dintre parametrii biochimici determinați, doar glucoza, acizii lactic și piruvic și xantin oxidaza au prezentat modificări semnificative. Ceilalți parametri au variat nesemnificativ (grupările sulfhidril) sau au prezentat tendințe de scădere (Na^+) sau creștere (K^+) prea mici.

Evoluția bifazică a modificărilor biochimice studiate se observă mai ales în cazul acizilor lactic și piruvic și al activității xantin oxidazei, dar nu și în cazul bicarbonatului care scade continuu. În timp ce lotul pretratat

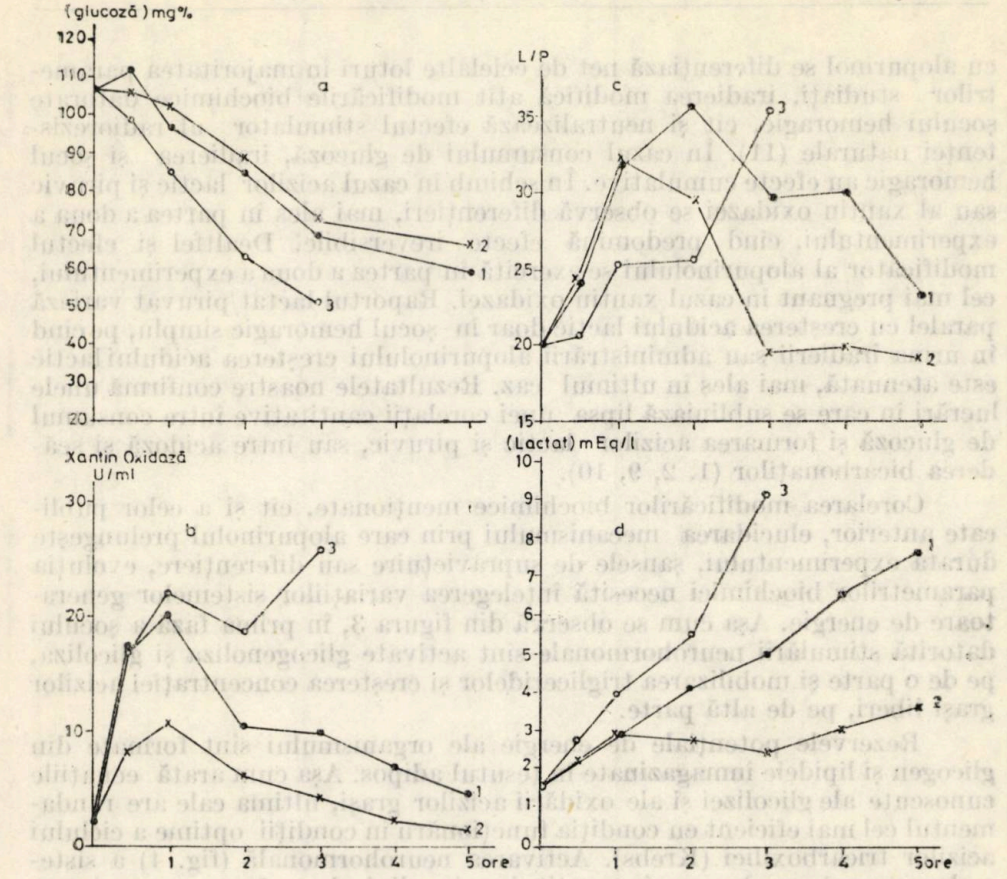


Fig. 1 — Modificările unor parametri biochimici în cursul şocului hemoragic

a) Glicemia; *b*) Activitatea xantin oxidazei; *c*) Raportul lactat/piruvat; *d*) Lactat, (*1*) şoc hemoragic, (*2*) şoc hemoragic în cursul căruia s-a administrat preventiv alopurinol, (*3*) şoc hemoragic la animale iradiate în prealabil (30 minute) cu 800 Rads.

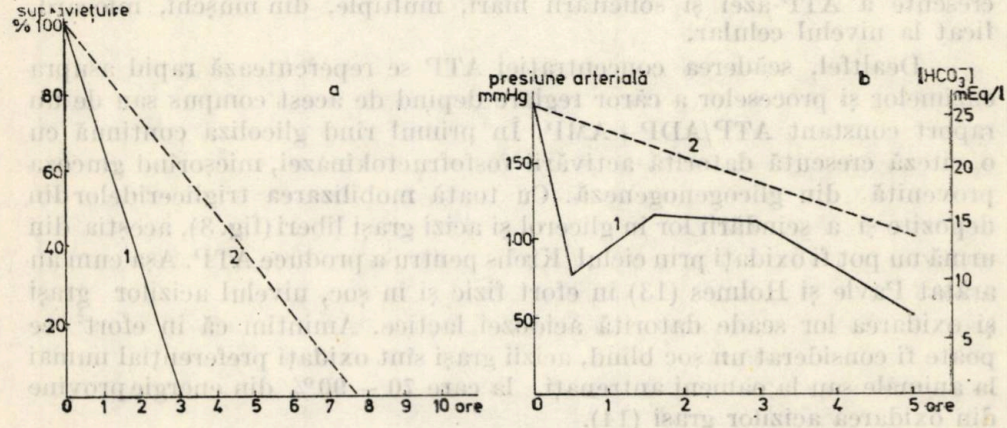


Fig. 2. — Variaţiile unor parametri în cursul şocului hemoragic experimental

a) Supravieţuirea, (*1*) şoc hemoragic (*2*) şoc hemoragic asociat cu administrare de alopurinol; *b*) presiunea arterială (*1*) şi rezerva alcalină exprimată în meq/l [HCO_3^-] (*2*).

cu alopurinol se diferențiază net de celelalte loturi în majoritatea parametrilor studiați, iradierea modifică atît modificările biochimice datorate șocului hemoragic, cît și neutralizează efectul stimulator al radiorezistenței naturale (11). În cazul consumului de glucoză, iradierea și șocul hemoragic au efecte cumulative. În schimb în cazul acizilor lactic și piruvic sau al xantin oxidazei se observă diferențieri, mai ales în partea a doua a experimentului, cînd predomină efecte ireversibile. Dealtfel și efectul modificator al alopurinolului se exercită în partea a doua a experimentului, cel mai pregnant în cazul xantin oxidazei. Raportul lactat/piruvat variază paralel cu creșterea acidului lactic doar în șocul hemoragic simplu, pe cînd în urma iradierii sau administrării alopurinolului creșterea acidului lactic este atenuată, mai ales în ultimul caz. Rezultatele noastre confirmă unele lucrări în care se subliniază lipsa unei corelații cantitative între consumul de glucoză și formarea acizilor lactic și piruvic, sau între acidoză și scăderea bicarbonaților (1, 2, 9, 10).

Corelarea modificărilor biochimice menționate, cît și a celor publicate anterior, elucidarea mecanismului prin care alopurinolul prelungește durata experimentului, șansele de supraviețuire sau diferențiere, evoluția parametrilor biochimici necesită înțelegerea variațiilor sistemelor generatoare de energie. Așa cum se observă din figura 3, în prima fază a șocului datorită stimulării neurohormonale sînt activate glicogenoliza și glicoliza, pe de o parte și mobilizarea trigliceridelor și creșterea concentrației acizilor grași liberi, pe de altă parte.

Rezervele potențiale de energie ale organismului sînt formate din glicogen și lipidele înmagazinate în țesutul adipos. Așa cum arată ecuațiile cunoscute ale glicolizei și ale oxidării acizilor grași, ultima cale are randamentul cel mai eficient cu condiția funcționării în condiții optime a ciclului acizilor tricarboxilici (Krebs). Activarea neurohormonală (fig. 4) a sistemelor generatoare de energie constituie prima linie de apărare a organismului în șocuri de diferite origini și duce la acumularea acizilor piruvic și lactic, se pare și propionic (12), acetat activ (AcSCoA), și $NADH_2$ (datorită hipoxiei). Într-o mai mică măsură se acumulează glucoză, care este însă rapid degradată, oxalocetat, citrat (1, 2, 9). Cu toată formarea accelerată de ATP acesta continuă să scadă mult (1, 2, 9), datorită activității crescute a ATP-azei și solicitării mari, multiple, din mușchi, miocard, ficat la nivelul celular.

Dealtfel, scăderea concentrației ATP se repercutează rapid asupra enzimelor și proceselor a căror reglare depind de acest compus sau de un raport constant ATP/ADP+AMP. În primul rînd glicoliza continuă cu o viteză crescută datorită activării fosfofructokinazei, micșorînd glucoza provenită din glicogenogeneză. Cu toată mobilizarea trigliceridelor din depozite și a scindării lor în glicerol și acizi grași liberi (fig. 3), aceștia din urmă nu pot fi oxidați prin ciclul Krebs pentru a produce ATP. Așa cum au arătat Pavle și Holmes (13) în efort fizic și în șoc, nivelul acizilor grași și oxidarea lor scade datorită acidozei lactice. Amintim că în efort ce poate fi considerat un șoc blînd, acizii grași sînt oxidați preferențial numai la animale sau la oameni antrenați, la care 70 — 90% din energie provine din oxidarea acizilor grași (14).

Blocarea proceselor de resinteză se instalează precoce; glicogenoneogeneza prin scăderea ATP şi creşterea glucozo-6-fosfatului, iar gluconeogeneza prin inhibarea piruvat carboxilazei de către ADP şi a piruvat carbokinazei de către AMP (2,9). Inhibarea ciclului Krebs constituie limita dintre şocul reversibil şi cel ireversibil. Inhibiţia acestui ciclu esenţial pentru energogeneză are loc datorită acumulării oxalacetatului ce inhibă succint dehidrogenaza, a citrat sintazei de către acizi graşi acilaţi (15), dar mai ales de către $NADH_2$ care inhibă citrat sintaza şi isocitric dehidrogenaza, implicată în reacţia limitantă a ciclului (2).

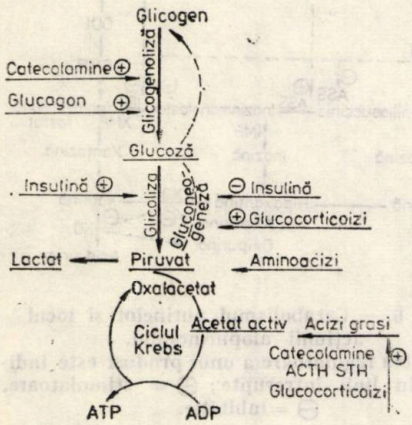


Fig. 3. — Activarea unor procese biochimice în prima fază a şocului.

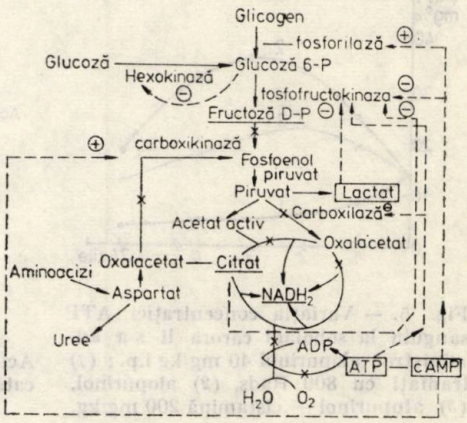


Fig. 4. — Modificări ale sistemelor biochimice producătoare de ATP în faza avansată a şocului. Activitatea regulatoare a unor produs este indicată prin linii întrerupte; x = căi metabolice blocate.

Acumularea citratului va produce inhibarea fosfofructokinazei, enzima regulatoare a glicolizei, iar glucozo-6-fosfatul va inhiba hexokinaza. Prin aceste etape succesive (fig. 3—5), datorită scăderii ATP se produce dereglarea proceselor vitale ale organismului, glicoliza marcînd ultimul sistem blocat, sugerat dealtfel de plafonarea glicemiei (fig. 1). Transportul defectuos al ADP prin membranele mitocondriale, epuizarea creatinfosfatului vor bloca şi un alt sistem generator de ATP, constituit din adenilat kinază şi creatinfosfat kinază (2).

Căile terapeutice în şoc sînt foarte variate în funcţie de etapa în care se intervine, de tipul şi gravitatea şocului şi de evoluţia parametrilor biochimici. Din punct de vedere energetic s-au încercat o varietate mare de substanţe cum ar fi ATP ca atare (16), glucoză şi insulină (2), aspartat (pentru stimularea ciclului Krebs (2)), dihidroxiacetonă (pentru stimularea glicolizei prin micşorarea $NADH_2$ (17)).

Rezultatele noastre (fig. 1,2) arată o creştere a supravieţuirii şi scăderi ale formării lactatului şi raportului L/P în urma administrării alopurinolului preventiv şi mai ales combinat preventiv-curativ. Alopurinolul (4-hidroxipirazolo (3,4-d) pirimidină) este un inhibitor specific al

xantin oxidazei cu o constantă K_i de $1 \cdot 10^{-7}$ M care și-a cucerit un rol marcant în tratamentul gutei și a litiazelor urice sau hiperuricemiilor provocate de medicamente, diabet sau toxice (18). Prin administrarea alopurinolului la șobolani (fig. 5) se observă o creștere a concentrației ATP din sînge, mai ales în prezența cistaminei ca donor de grupări SH libere. Așa cum a arătat și Laborit și colab. (17) grupările SH par să aibă un rol major în protecția permeabilității membranelor granulare de stocaj ale

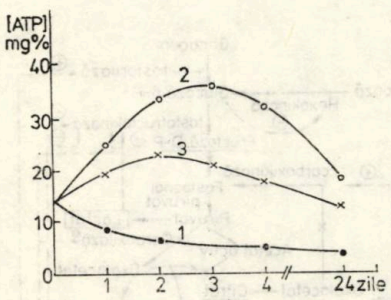


Fig. 5. — Variația concentrației ATP sanguin la șobolani cărora li s-a administrat alopurinol 40 mg/kg i.p.; (*1*) iradiați cu 800 Rads, (*2*) alopurinol, (*3*) alopurinol + cistamină 200 mg/kg.

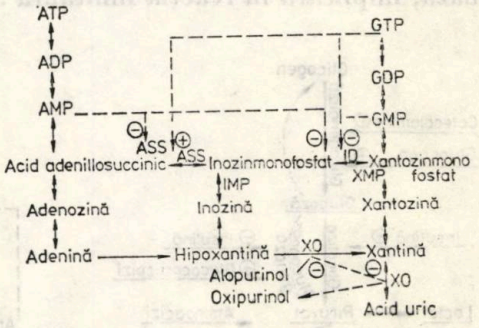


Fig. 6. — Catabolismul purinelor și locul acțiunii alopurinolului.
Activitatea regulatoare a unor produși este indicată prin linii întrerupte; ⊕ = stimulatoare, ⊖ = inhibiție.

catecolaminelor. Efectul alopurinolului este însă mult mai complex decît cel reprezentat în figura 6. Catabolizarea crescută a ATP în șoc, imposibilitatea refacerii lui prin glicoliză și ciclul Krebs blocat, deschide problema refacerii ATP din „poolul" de adenine a căror catabolizare este blocată de alopurinol. Această resinteză „de novo" a ATP din compuși endogeni permite o cale sigură și economică pentru organism explicînd astfel creșterea supraviețuirii în șoc și a concentrației ATP în urma administrării alopurinolului (fig. 5).

Pe de altă parte alopurinolul mai inhibă catabolizarea pirimidinelor (la nivelul orotat fosforibozil transferazei), micșorează oxidarea compușilor SH (11), crește concentrațiile acidului inosinic și adenozinei (fig. 6) care împreună cu ATP acționează ca regulator al circulației cardiace și musculare fiind folosiți în ischemia cardiacă (19), oligurie și ischemie renală (20). Dealtfel, în aceste ultime cazuri s-a și demonstrat creșterea concentrației ATP în urma administrării alopurinolului.

CONCLUZII

1) Dintre modificările biochimice cele mai semnificative rezultate în urma șocului hemoragic se impun determinările acizilor lactic și piruvic, glicemia și rezerva alcalină. În cazul unui tratament pentru creșterea resurselor energetice este utilă și dozarea activității xantin oxidazei plasmatice.

2) Alopurinolul administrat cît mai precoce permite o creştere semnificativă a supravieţuirii prin menţinerea unei concentraţii necesare în ATP. Adăogarea unui donor de grupări SH potenţează efectul alopurinolului. Prin creşterea concentraţiei ATP se creează posibilităţi organismului de supravieţuire şi stimularea proceselor vitale metabolice în care ATP acţionează ca modificator.

Prezentat la redacţie
la 16 decembrie 1977.

Spitalul Clinic Fundeni
Clinica de Radiobiologie

MODIFICATIONS OF THE ENERGY-PRODUCING SYSTEMS IN THE SHOCK STATES

SUMMARY

Following 50% hemorrhagic shock in dogs, biphasic modifications of some biochemical parameters are produced. The most significant modifications are: decrease of glycemia, the increase of lactate /pyruvate ratio and those of xanthine oxidase activity. The preventive administration of an inhibitor of xanthine oxidase, allopurinol allows an increase of survival time and the variation towards the initial values of the biochemical parameters modified by the shock. Some of the energetic mechanisms involved in the shock are discussed, especially the consequences of ATP decrease during the shock and the hypothetical way in which allopurinol is acting.

BIBLIOGRAFIE

1. W. Schumer, P. R. Erve, Circulat. Shock, **2**, 109 (1975).
2. I. Şuteu, T. Bandilă, A. Cafrită, A. Bucur, V. Cîndea, *Şocul*, Editura Militară, 1973.
3. I. Chagnon, J. Jeandet, H. Lestradet, Rev. Et. Clin. Biol., **6**, 953 (1961).
4. T. E. Friedman, G. E. Hangen, J. Biol. Chem., **147**, 415 (1943).
5. G. Ceriotti, Clin. Chim. Acta, **24**, 311, (1969).
6. O. Folin, J. Biol. Chem., **88**, 85 (1930).
7. A. J. Clark, D. E. Pratt, Life Sci., **19**, 887 (1976).
8. R. Olinescu, I. Mărgineanu, Rev. roum. Biochim., **10**, 285 (1973).
9. J. P. Filkins, B. J. Buchanan, R. P. Cornell, Circulat. Shock, **2**, 129 (1975).
9. R. W. Hopkins, J. Abraham, F. A. Someone, J. Surgical Res., **19**, 381 (1975).
11. R. Olinescu, N. Pascu, S. Niţă, Rev. roum. Biochim., **15**, 151 (1978).
12. T. R. Hendreson, R. K. Jones, J. Trauma, **14**, 305 (1974).
13. P. Pavle, W. L. Holmes, Lipids, **8**, 142 (1973).
14. J. Karlson, B. Santin, Acta Physiol. Scand., **82**, 115, 455 (1971).
15. H. W. Heldt, Angew. Chemie, Int. Ed., **9**, 792 (1972).
16. W. H. Massion, Am. J. Surg., **110**, 342 (1965).
17. H. Laborit, C. Baron, B. Weber, Agressologie, **10**, 189 (1969).
18. W. N. Kelley, Enzyme, **18**, 161 (1974).
19. M. F. Oliver, Proc. Roy. Soc. Med., **69**, 207 (1976).
20. S.K. Cunningham, T. V. Keavery, P. Fitzgerald, Brit. J. Surg., **61**, 562 (1974).

DOZAREA FOSFATULUI DIN FOSFOLIPIDELE SEPARATE PRIN CROMATOGRAFIE ÎN STRAT SUBŢIRE PE SILICAGEL

VICTOR I. POP, DORIN PORUŢIU, şi GHEORGHE BENGA

Rezumat. S-au analizat factorii care interferează la determinarea fosfatului din fosfolipidele separate prin cromatografie în strat subţire pe silicagel. S-a constatat că silicagelul interferează în reacţia de culoare Lowry-Lopez. De aceea este necesară o corecţie pentru cantitatea de silicagel din probă. Se descrie un procedeu de dozare a fosfatului bazat pe reacţia Fiske-Subbarow în care nu interferează silicagelul. Acest procedeu a fost aplicat la dozarea fosfolipidelor din membranele mitocondriale hepatice umane şi de şobolan.

Estimarea cantitativă a fosfolipidelor, componente de bază ale membranelor biologice, se face în mod curent prin dozarea fosfatului anorganic obţinut prin mineralizarea fosfolipidelor. Majoritatea metodelor de dozare a fosfatului anorganic se bazează pe reducerea fosfomolibdatului (format în mediu acid din fosfatul anorganic şi molibdat de amoniu) într-un complex de culoare albastră.

În cazul dozării fosfatului din fosfolipidele separate prin cromatografie în strat subţire pe silicagel se pune problema utilizării unui procedeu care să elimine interferenţa silicagelului în reacţia de culoare. De aceea este important ca mineralizarea să se facă în condiţii standardizate pentru a obţine rezultate reproductibile.

În lucrarea de faţă, analizînd cîteva metode pentru mineralizarea şi dozarea fosfatului fosfolipidic, se descrie un procedeu folosit în laboratorul nostru prin care se obţin rezultate precise şi reproductibile.

MATERIALE ŞI METODE

1. *Reacţia de dozare a fosfatului bazată pe metoda Lowry şi Lopez* (1) (2).

a) Mineralizarea. Spoturile de fosfolipide se rad de pe plăcile cu silicagel şi se transferă cantitativ în eprubete; se adaugă 0,5 ml apă bidistilată şi 0,5 ml HCl concentrat. Se evaporă la sec la 180 °C, apoi se adaugă 0,3 ml $HClO_4$ concentrat şi se efectuează digestia probelor timp de 20 minute la 180°C.

b) Reacţia de culoare. Se aduce volumul fiecărei probe la 3 ml adăugînd 1,7 ml apă bidistilată, apoi se adaugă 0,3 ml molibdat de amoniu 2,5% şi 0,2 ml acid ascorbic 1% (preparat de extemporaneu). Se agită, apoi se lasă 30 minute la temperatura camerei pentru dezvoltarea culorii. Sensibilitatea metodei se poate creşte efectuînd dezvoltarea culorii la 100°C timp de 10 minute. Se determină extincţia la 700 nm, în cuva de 1 cm, faţă de apă bidistilată.

2. *Reacţia de dozare a fosfatului bazată pe metoda Fiske-Subbarow* (3) (4).

a) Mineralizarea. Spoturile cu fosfolipide se transferă cantitativ de pe plăcile cu silicagel în eprubete de sticlă, se adaugă 0,4 ml H_2SO_4 concentrat şi se încălzeşte 60 minute la 180°C. După răcirea eprubetelor se adaugă 0,2 ml $HClO_4$ concentrat şi se mineralizează încă 60 minute la 180°C. La sfîrşitul mineralizării conţinutul eprubetelor trebuie să fie incolor.

b) Reacția de culoare. Reactivul de culoare conține : 0,2g% Na_2SO_3, 0,6 g% $Na_2S_2O_5$ și 0,10 g% acid 1-amino-2-naftol-4-sulfonic. Sulfitul de sodiu și acidul 1-amino-2-naftol-4-sulfonic se folosesc ca reducători, iar tiosulfatul de sodiu pentru a preveni formarea sărurilor complexe.

Probele mineralizate se răcesc la temperatura camerei, apoi se adaugă la fiecare 5 ml apă bidistilată și se răcesc la ghiață. Se adaugă în fiecare eprubetă 0,5 ml molibdat de amoniu 10%, apoi 0,5 ml reactiv de culoare și se agită bine. Se dezvoltă culoarea 10 minute la 100°C, apoi se citește extincția la 700 nm sau la 830 nm, în cuva de 1 cm, față de apă bidistilată. Din extincțiile citite se scade extincția martorului, care conține silicagel și reactivii descriși anterior. Prin citirea extincției la 830 nm se crește sensibilitatea metodei.

Extincțiile s-au citit la spectrofotometru VSU-1 (Carl Zeiss, Jena, R.D.G.) sau la un spectrofotometru Jobin-Yvon (Longjumeau, Franța).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

O problemă esențială pentru metodele de dozare a fosforului din fosfolipidele separate prin cromatografie în strat subțire, o reprezintă interferența silicagelului. Această interferență este deosebit de mare în cazul metodei Lowry-Lopez; după cum se observă în figura 1, chiar în absența

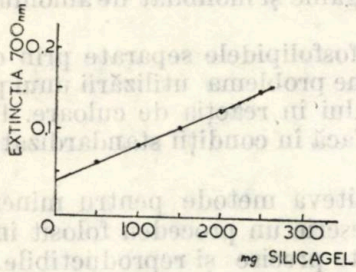


Fig. 1. — Interferența silicagelului în reacția de culoare Lowry-Lopez.

Peste cantitățile de silicagel cîntărite și introduse în eprubete s-a adăugat 0,5 ml apă bidistilată și 0,5 ml HCl concentrat. Probele au fost în continuare prelucrate după cum se descrie la *Materiale și metode.*

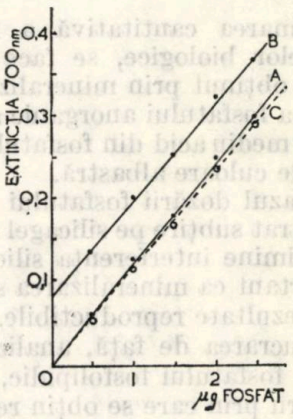


Fig. 2. — Curba de etalonare pentru dozarea fosforului prin metoda Lowry-Lopez.

A) În absența silicagelului : cantități crescînde dintr-o soluție standard fosfat (5 μg/ml) se introduc în eprubete, apoi se aduce volumul la 0,5 ml cu apă distilată, se adaugă 0,5 ml HCl concentrat și se prelucrează după cum se descrie la *Materiale și metode; B)* Se procedează ca la punctul *A)* dar se adaugă de la început în fiecare probă 100 mg silicagel; *C)* S-au reprezentat diferențele dintre extincțiile probelor de la punctul *B)* și extincția martorului ce conținea 100 mg silicagel.

fosfolipidelor silicagelul dă o reacție de culoare, proporțională cu cantitatea de silicagel. Dacă se adaugă silicagel în cantitate constantă la stabilirea curbei de etalonare cu fosfat anorganic se obține o curbă lineară (fig. 2) pe intervalul 0—2,5 μg fosfat anorganic, respectiv 0—65 μg fosfatidilcolină.

Ținînd seama de aceste observații se poate utiliza metoda Lowry-Lopez la dozarea fosfatului din fosfolipidele separate prin cromatografie

în strat subţire pe silicagel dacă se cunoaşte precis cantitatea de silicagel din probă (de exemplu cîntărind proba sau măsurînd aria spotului cînd se cunoaşte grosimea stratului de silicagel). Acest mod de lucru însă este nepractic. De aceea este preferabilă folosirea unei metode de dozare a fosfatului în care să nu interfereze silicagelul.

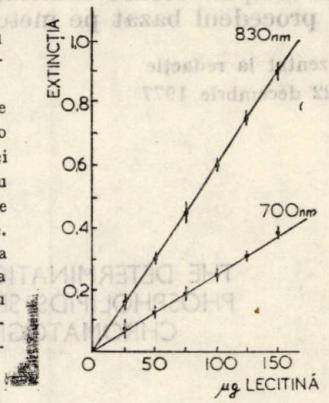


Fig. 3. — Curba de etalonare pentru dozarea fosfatului prin metoda Fiske-Subbarow.

Cantităţi crescînde (de la 0 la 100 µl) dintr-o soluţie de fosfatidilcolină (2,5 mg/ml) se repartizează cu o microseringă Hamilton pe suprafeţe egale ale unei plăci de sticlă pe care se află un strat de silicagel cu grosimea de 0,25 mm. După uscare silicagelul se rade de pe plăci şi se transferă cantitativ în eprubete. Se procedează în continuare după cum este descris la *Materiale şi metode*. Martorul conţinînd silicagel avea extincţia identică cu un martor fără silicagel. S-au reprezentat grafic extincţiile la 700 nm şi 830 nm. Rezultatele reprezintă media (punct) ± deviaţia standard (linie verticală) pentru 9 determinări.

Metoda Fiske-Subbarow prezintă avantajul că silicagelul nu influenţează reacţia de culoare. Curba de etalonare, liniară (fig. 3), este identică în prezenţa sau în absenţa silicagelului. De aceea recomandăm procesul bazat pe metoda Fiske-Subbarow, aşa cum este utilizat în laboratorul nostru, pentru dozarea fosfatului din fosfolipidele separate prin cromatografie în strat subţire de silicagel. Folosind acest procedeu am determinat fosfolipidele din membranele mitocondriale hepatice umane şi de şobolan. Valorile obţinute de noi (tabela 1) sînt concordante cu datele din literatură (5).

Tabela 1

Compoziţia fosfolipidică a membranelor mitocondriale hepatice umane şi de şobolan.*)

Specia de fosfolipide	% din totalul fosfolipidelor	
	ficat uman	ficat de şobolan
Fosfatidilcolină	40,5±4,0	41,5±5,7
Fosfatidiletanolamină	31,8±3,6	32,7±4,5
Cardiolipină	14,0±1,2	14,2±1,7
Fosfatidilinozitol	6,2±1,2	5,6±1,1
Fosfatidilserină	4,0±0,9	3,9±0,7
Sfingomielină	2,4±0,7	2,1±0,5
Acid fosfatidic	1,0±0,1	0,9±0,1

*) Rezultatele reprezintă media ± eroarea standard a mediei pentru 6 determinări.

O ultimă problemă asupra căreia insistăm este posibilitatea ca sticla din eprubetele în care se face mineralizarea să interfereze în reacţia de culoare. Aceasta se testează încălzind în ele acid percloric 70% timp de o

oră la 180°C. În unele cazuri după această tratare a eprubetelor, acestea rezistă în continuare la mineralizarea fosfolipidelor, fără a mai produce interferență.

În concluzie, pentru dozarea fosfolipidelor din spoturile separate prin cromatografie pe silicagel se poate utiliza metoda Lowry-Lopez făcînd corecția corespunzătoare cantității de silicagel din probă, sau, preferabil, folosind procedeul bazat pe metoda Fiske-Subbarow.

Prezentat la redacție
la 22 decembrie 1977

Institutul de Medicină și Farmacie Cluj-Napoca, Disciplina de biochimie și laboratorul de microscopie electronică

THE DETERMINATION OF PHOSPHATE FROM PHOSPHOLIPIDS SEPARATED BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY ON SILICAGEL

SUMMARY

The factors interfering in the determination of phosphate from phospholipids separated by thin-layer chromatography on silicagel have been analysed. It has been found that the silicagel interferes in the Lowry-Lopez reaction. Therefore a correction for the amount of silicagel in the sample is necessary. A procedure for the determination of phosphate based on the Fiske-Subbarow reaction, in which the silicagel does not interfere, has been described. This procedure has been applied to the determination of phospholipids in human and rat liver mitochondrial membranes.

BIBLIOGRAFIE

1. O. Lowry, J. A. Lopez, J. Biol. Chem., **152**, 421 (1946).
2. P. S. Chen, T. Y. Toribara, H. Warner. Anal. Chem., **28**, 1756 (1956).
3. C. H. Fiske, I. J. Subbarow, J. Biol. Chem., **66**, 375 (1925).
4. G. R. Bartlett, J. Biol. Chem., **234**, 466 (1959).
5. G. Rouser, G. J. Nelson, S. Fleischer, G. Simon, în „Biological Membranes" (Chapman D., ed.), vol. 1,5 —(1968), Academic Press, New York.

OBŢINEREA ŞI CARACTERIZAREA UNOR PREPARATE ENZIMATICE IMOBILIZATE, CU APLICAŢII ÎN INDUSTRIA LAPTELUI

H. D. SCHELL, DANIELA BĂNĂŢEANU, T. BENŢIA

Rezumat. Se descriu metodele de imobilizare a unor cheaguri de origine animală şi microbiană prin legarea lor covalentă de agaroză reticulată şi activată cu BrCN, precum şi proprietăţile caracteristice ale preparatelor enzimatice imobilizate obţinute. Prin fixare pe suportul insolubil, enzimele studiate îşi păstrează proprietăţile lor catalitice prezentînd o activitate proteolitică reziduală de 42,7% în cazul cheagului de origine animală, respectiv de 54,5% în cazul cheagului de origine microbiană. În urma imobilizării, cele două tipuri de cheag, cu aplicare în industria alimentară la coagularea laptelui în vederea obţinerii de brînzeturi, nu-şi modifică pH-ul lor optim de acţiune şi rămîn active şi după repetate refolosiri. Ambele preparate îşi menţin capacitatea de a coagula laptele şi după imobilizare. Derivatul imobilizat al cheagului microbian prezintă însă proprietăţi fizico-chimice şi catalitice net superioare celui obţinut de la cheagul de origine animală.

Proprietăţile avantajoase noi dobîndite de enzime în urma imobilizării lor cum sînt posibilitatea refolosirii lor repetate, îndepărtarea lor uşoară şi completă din produsul final de reacţie, stabilitatea lor mai crescută la modificări ale pH-ului sau a temperaturii mediului de reacţie şi altele, deschid tot mai larg perspectiva folosirii lor şi într-o serie de procese tehnologice industriale mai ales în industria alimentară, farmaceutică sau chiar şi chimică (1) (2) (3). Dintre exemplele mai importante de aplicare practică a enzimelor imobilizate se pot aminti de pildă transformarea amidonului în glucoză, transformarea glucozei în fructoză, limpezirea vinurilor şi a sucurilor de fructe, obţinerea de brînzeturi, sinteze de peniciline, scindarea amestecurilor de D, L-aminoacizi şi altele.

În lucrarea de faţă se prezintă modul de obţinere şi proprietăţile specifice ale unor preparate enzimatice imobilizate obţinute prin legarea covalentă de agaroză reticulată şi activată cu BrCN a unor cheaguri atît de origine animală cît şi de origine microbiană, folosite în mod curent la coagularea laptelui în industria brînzeturilor. Cheagul de origine microbiană este o enzimă coagulantă elaborată de *Mucor miehei* care tinde să înlocuiască cu succes cheagul animal tradiţional, a cărui producţie pe plan mondial a devenit insuficientă din motive zootehnice şi economice (4).

În literatura de specialitate se găseşte un număr relativ mic de lucrări referitoare la obţinerea şi studiul de enzime coagulante imobilizate. Dintre acestea pot fi amintite cele consacrate pepsinei imobilizate (5) (6) sau a reninei şi α-chimotripsinei imobilizate (7).

MATERIAL ŞI METODE

În cercetările noastre am folosit două preparate enzimatice care se aplică curent în industria alimentară la coagularea laptelui în vederea fabricării brînzeturilor, şi anume un produs

fabricat în ţară şi cunoscut sub denumirea comercială „Ara" (cheag praf de origine animală, extras din mucoasa gastrică de viţel cu un conţinut proteic de 830 mg proteină/g produs uscat) şi un produs din import, cunoscut sub denumirea comercială „Rennilase", produs de firma „Novo Industrie" — Danemarca (cheag lichid microbian, extras din Mucor miehei) cu un conţinut proteic de 216 mg proteină/ml). Drept suport insolubil s-a folosit agaroza reticulară elaborată în laboratorul nostru (8) şi activată cu BrCN procurat de la firma Serva International — Heidelberg.

Imobilizarea preparatelor enzimatice. 10 ml gel perlat de agaroză reticulată şi activată cu BrCN după indicaţiile date de Axén şi colab. (9) au fost trataţi cu 0,5 ml Rennilase diluată cu 4,5 ml soluţie $NaHCO_3$ 0,1 M şi lăsaţi să reacţioneze la temperatura camerei peste noapte. A doua zi, se spală preparatul enzimatic insolubil obţinut, alternativ cu apă distilată şi cu o soluţie de NaCl 0,5 M, pînă la îndepărtarea completă a enzimei nelegate.

În cazul preparatului enzimatic indigen „Ara", cei 10 ml gel de agaroză activată au fost trataţi cu o soluţie de 0,2 g enzimă dizolvată în 5 ml soluţie $NaHCO_3$ 0,1 M, procedîndu-se în continuare ca mai sus.

Determinarea cantităţii de enzime legate de suport. Cantitatea de enzimă legată covalent de gelul de agaroză s-a stabilit prin determinarea conţinutului proteic din supernatantul amestecului de reacţie înainte şi după legare prin spectrofotometrare la 280 nm, folosind un spectrofotometru VSU-2—P Carl Zeiss, Jena.

Determinarea activităţii catalitice a preparatelor enzimatice libere şi imobilizate, s-a efectuat după metoda indicată de Laskowski (10), procedîndu-se astfel: peste 1 ml soluţie de cazeină Hammarsten 0,8 %, pH 7,0 se adaugă 0,2 ml soluţie de enzimă 1 % — în cazul enzimelor libere — sau 0,2 ml gel enzimatic — în cazul enzimelor imobilizate — şi 0,8 ml tampon borat, pH 8,0. După 30 min de incubare la 37°C, cu agitare din cînd în cînd, reacţia enzimatică este stopată: în cazul enzimelor libere prin adăugarea a 3 ml de soluţie acid triclor acetic 5 %, iar în cazul enzimelor imobilizate prin îndepărtarea gelului prin filtrare, adăugînd apoi şi în acest caz în filtratele obţinute cîte 3 ml soluţie acid tricloracetic 5 %. După agitarea probelor şi un repaus la temperatura camerei timp de 20 min, se filtrează şi se determină cantitatea de compuşi proteici solubili din filtrat prin spectrofotometrare la 280 nm. Extincţiile obţinute sînt transformate cu ajutorul unei curbe etalon în mM tirozină. Activitatea proteolitică a enzimelor studiate este exprimată în μmoli tirozină/min/mg proteină. Gelurile enzimatice separate prin filtrare pot fi refolosite după o prealabilă spălare la o nouă reacţie enzimatică.

Determinarea influenţei pH-ului asupra activităţii catalitice a preparatelor enzimatice libere şi imobilizate. Variaţia activităţii enzimatice în funcţie de pH s-a urmărit folosind medii de reacţie cu valori de pH de 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 şi 10,0, realizate cu un tampon veronal-acetat şi păstrînd restul condiţiilor identice ca cele de mai sus.

Determinarea activităţii catalitice a preparatelor enzimatice libere şi imobilizate în funcţie de temperatura de preincubare. În vederea evidenţierii unor eventuale modificări apărute în termostabilitatea enzimelor studiate în urma legării lor covalente de suporturi insolubile, am incubat paralel atît enzimele libere cît şi cele legate timp de 1 oră, la următoarele temperaturi: 37°, 45°, 55°, 65° şi 75°C. După răcirea probelor s-a determinat activitatea proteolitică în condiţiile descrise anterior.

Determinarea capacităţii de coagulare a preparatelor enzimatice solubile şi imobilizate. Capacitatea de coagulare se bazează pe măsurarea timpului necesar pentru coagularea laptelui de către o anumită cantitate de enzimă (11). Activitatea de coagulare a unui preparat se calculează în unităţi Soxhlet. O unitate Soxhlet reprezintă după cum se ştie, cantitatea de enzimă care coagulează 1 ml substrat în 40 min de incubare, la 35°C (USx).

Ca substrat s-a folosit o soluţie 10 % de lapte praf degresat, reconstituit într-o soluţie de $CaCl_2$ 0,01 M, cu pH 6,25. Pentru enzimele libere s-a procedat astfel: s-a dizolvat 1 g cheag praf, într-un balon cotat de 100 ml în 70—80 ml apă distilată la 35—45°C, completînd apoi volumul la semn cu apă distilată. În cazul cheagului microbian lichid se prepară similar o soluţie 10 %. Pentru a determina activitatea cheagului se introduc într-un pahar Berzelius 100 ml lapte standard, preparat ca mai sus (pH 6,25), ţinut pe baie de apă la 35°C şi se adaugă 1 ml soluţie de cheag. Se omogenizează şi se lasă proba în repaus pe baia de apă la 35°C, măsurînd cu un cronometru timpul în secunde pînă în momentul apariţiei coagulului, cu separarea unui zer limpede.

Activitatea enzimei se estimează în calcularea puterii de coagulare (P), pentru 1 g cheag (produs solid), respectiv pentru 1 ml (produs lichid), după formula:

$$P = \frac{L \times 2400}{C \times t} \text{ USx}$$

în care,
L = cantitatea de lapte, în ml
C = cantitatea de cheag, în g
t = timpul de coagulare, în sec
2400 = durata de coagulare standard, în sec (40 min).

În cazul preparatelor enzimatice imobilizate, testarea puterii de coagulare s-a făcut în două variante. În prima variantă, s-a introdus 1 ml gel enzimatic în 10 ml lapte standard, reconstituit ca mai sus şi s-a determinat timpul necesar pentru apariţia coagulului.

Într-o a doua variantă, s-a introdus gelul enzimatic într-o coloană cromatografică, cu dimensiunile de 1×7 cm, şi s-a trecut laptele reconstituit pe această coloană cu o viteză de scurgere de 20—25 ml lapte/oră, la temperatura de 15—16°C. S-au colectat probe de lapte de cîte 5 ml şi s-a determinat timpul de coagulare la 35°C.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Prin legarea covalentă a celor două enzime studiate de agaroză perlată, reticulată şi activată cu BrCN, se obţin preparate enzimatice insolubile, cu activitate reziduală considerabilă. Astfel, prin legarea covalentă a cheagului animal „Ara" de suportul insolubil se obţine un preparat enzimatic cu activitate reziduală de 42,7% şi un conţinut proteic de 10,3 mg proteină/ml gel. În cazul preparatului microbian „Rennilase" cuplat de suportul insolubil, activitatea reziduală este chiar de 54,5% iar conţinutul proteic de 5,4 mg proteină/ml gel. Preparatele enzimatice insolubile obţinute de noi au o activitate reziduală net superioară celor indicate în literatură. Green şi Crutehfield (5) de pildă, descriu un preparat insolubil pe bază de cheag animal fixat tot pe agaroză, care are o activi-

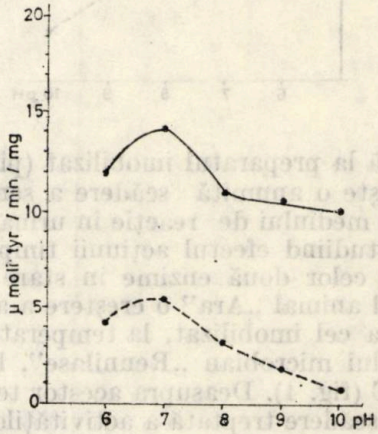


Fig. 1. — Variaţia activităţii proteolitice a cheagului de origine animală „Ara" în stare liberă (—) şi legată (— — —) în funcţie de pH.

tate reziduală situată sub 1%. Menţionăm că rezultatele obţinute de noi s-au reprodus cu ocazia repetatelor imobilizări efectuate în cursul realizării prezentei lucrări.

Prin legarea covalentă de suportul insolubil, cele două enzime studiate de noi nu-şi modifică pH-ul lor optim de acţiune. Aşa după cum rezultă din figura 1, atît forma liberă cît şi cea legată a enzimei de origine animală „Ara", prezintă activitatea maximă la pH 7,0. Se observă toto-

dată o scădere a activităţii catalitice în cazul ambelor forme de enzimă la modificări ale pH-ului atît spre valori acide cît şi alcaline. Spre deosebire de preparate ale altor enzime imobilizate descrise în literatură, derivatul insolubilizat al cheagului animal prezintă însă o scădere mai pronunţată în comparaţie cu enzima liberă.

În cazul preparatului microbian „Rennilase" (fig. 2), maximul de activitate catalitică, este situat pentru ambele enzime, în condiţiile noastre de lucru, la pH 6,0. Şi la această enzimă, se observă cu creşterea pH-ului, o scădere treptată a activităţii enzimatice, atît pentru enzima liberă cît şi pentru cea legată, scădere care de data aceasta este însă mai puţin pro-

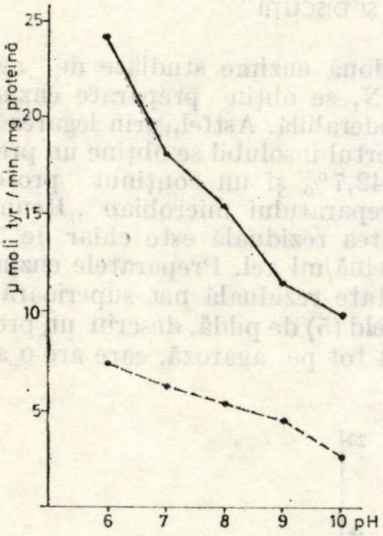


Fig. 2. — Variaţia activităţii proteolitice a cheagului de origine microbiană „Rennilase" în stare liberă (———) şi legată (— — —) în funcţie de pH.

nunţată la preparatul imobilizat (pînă la un pH în jur de 9,5), fapt care dovedeşte o anumită scădere a sensibilităţii enzimei faţă de variaţii de pH ale mediului de reacţie în urma imobilizării.

Studiind efectul acţiunii timp de 60 min a diferitelor temperaturi asupra celor două enzime în stare liberă şi legată, se constată pentru cheagul animal „Ara" o creştere a activităţii proteolitice atît la cel liber cît şi la cel imobilizat, la temperatura de 45°C, (fig. 3), situată în cazul cheagului microbian „Rennilase", liber şi imobilizat, la o temperatură de 55°C (fig. 4). Deasupra acestor temperaturi de preincubare se observă apoi o scădere treptată a activităţilor proteolitice, care la enzima imobilizată de origine animală este de asemenea mai accentuată decît la forma ei nelegată, liberă, o comportare similară cu cea observată şi cu ocazia studierii efectului pH-ului asupra activităţii proteolitice a acestor enzime.

În cazul enzimei de origine bacteriană, în schimb, se observă o sensibilitate mai redusă faţă de acţiunea temperaturii în urma imobilizării. Astfel, în timp ce enzima liberă îşi pierde aproape 60% din activitatea ei iniţială, în urma menţinerii ei timp de 60 min la 65°C, enzima legată îşi pierde în aceste condiţii doar 25% din activitatea iniţială. În urma prein-

cubării la 75°C, tot timp de 60 min, enzima liberă își mai păstrează doar 25% din activitatea ei inițială, în timp ce cea legată prezintă în aceste condiții încă peste 60% din activitatea ei inițială. Această stabilitate a enzimei legate față de temperatură se poate explica printr-o stabilizare a structurii moleculei proteice în urma fixării pe suportul insolubil. Faptul că nu s-a putut observa același fenomen și în cazul enzimei de origine animală „Ara", s-ar putea datora originei diferite a acestor două enzime.

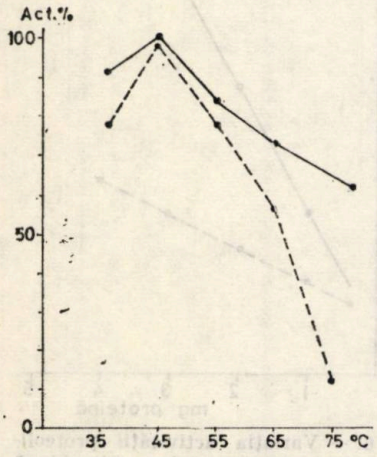


Fig.3. — Influența temperaturii de preincubare cu o durată de 60 min asupra activității proteolitice ale cheagului de origine animală „Ara" în stare liberă (———) și legată (— — —).

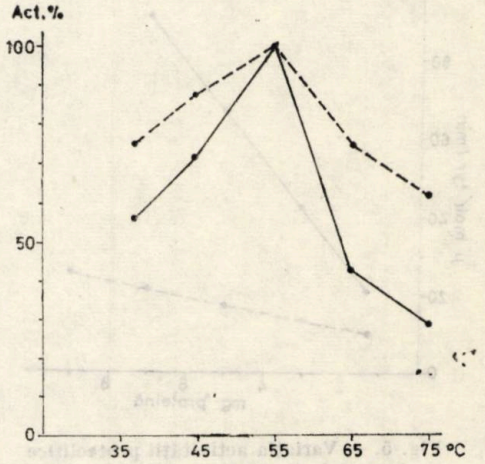


Fig. 4. — Influența temperaturii de preincubare cu o durată de 60 min asupra activității proteolitice ale cheagului de origine microbiană „Rennilase" în stare liberă (———) și legată (— — —)

În figurile 5 și 6 se prezintă variația activității enzimatice a celor două enzime proteolitice de origine diferită, în stare liberă și legată, în funcție de cantitatea lor. Pentru ambele enzime se observă o creștere liniară a activității proteolitice odată cu creșterea concentrației enzimei din mediul de reacție, atît pentru forma liberă cît și cea imobilizată.

Studiind posibilitatea aplicării preparatelor enzimatice insolubilizate obținute de la cheagul animal și cel microbian în procesul de coagularea laptelui am constatat că ambele preparate își păstrează capacitatea coagulantă și după imobilizare. După cum rezultă însă din tabela 1 există o deosebire foarte mare între puterile de coagulare ale celor două preparate. Astfel, în timp ce preparatul imobilizat al cheagului microbian prezintă o putere de coagulare de 13635 unități Soxhlet (USx), ceea ce corespunde la 20% din puterea enzimei libere, derivatul insolubil al cheagului de origine animală prezintă o putere de coagulare doar de 1100 USx, ceea ce reprezintă numai 0,61% din capacitatea enzimei libere. Din acest motiv

am folosit în varianta cu coloană enzimatică doar produsul imobilizat obţinut de la cheagul microbian. Produsul a rămas activ după zeci de ore de funcţionare, timp de mai multe zile, asigurînd tot timpul şi o bună viteză de curgere prin coloană.

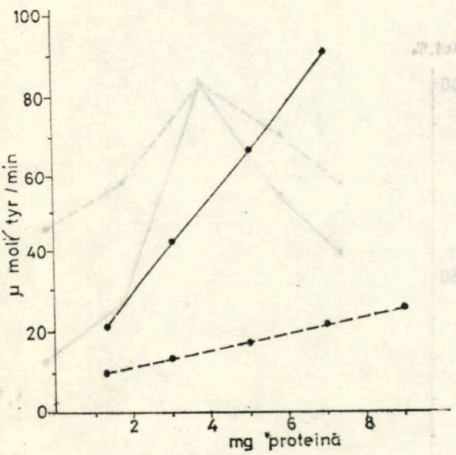


Fig. 5. — Variaţia activităţii proteolitice a cheagului de origine animală „Ara" în funcţie de concentraţia lui: (———) enzima liberă; (— — —) enzima legată

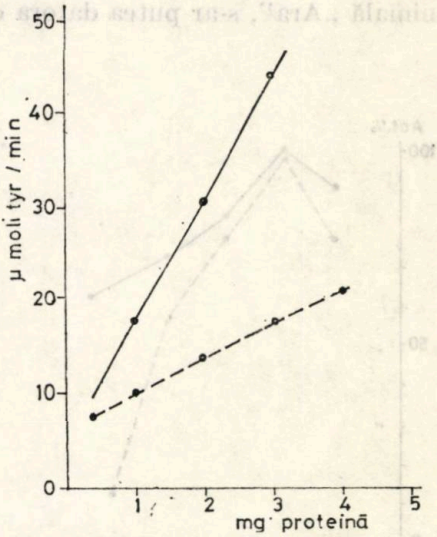


Fig. 6. — Variaţia activităţii proteolitice a cheagului de origine microbiană „Rennilase" în funcţie de concentraţia lui: (———) enzimă liberă; (— — —) enzimă legată.

Tabela 1

Capacităţile de coagulare a laptelui ale preparatelor enzimatice libere şi imobilizate de origine animală şi microbiană

Preparatul enzimatic	Capacităţile de coagulare exprimate în unităţi Soxhlet (USx)	Capacităţile de coagulare exprimate în %	Timpul de coagulare (min)
Cheag animal „Ara" liber	180 725	100	2,3
Cheag animal „Ara" imobilizat	1 100	0,61	18
Cheag microbian „Rennilase" liber	68 180	100	2,6
Cheag microbian „Rennilase" imobilizat	13 635	20	6

CONCLUZII

1. Preparatele enzimatice insolubile obținute prin legarea cheagului de origine animală „Ara" și a celui de origine microbiană „Rennilase" de agaroză reticulată și activată cu BrCN prezintă activități enzimatice reziduale de 42,7%, respectiv 54,5% și un conținut proteic de 10,3 mg, respectiv 5,4 mg/ml gel enzimatic.

2. Prin imobilizare, enzimele studiate nu-și modifică pH-ul lor optim de acțiune și-și păstrează proprietatea de a coagula laptele.

3. Gelurile enzimatice obținute își păstrează proprietățile lor proteolitice și cele de a coagula laptele și după repetate refolosiri și sînt stabile în timp.

4. Dintre cele două preparate enzimatice insolubile studiate în lucrarea de față, cel obținut de la cheagul microbian „Rennilase" prezintă proprietăți net superioare față de preparatul imobilizat obținut de la cheagul animal „Ara", prin faptul că posedă o activitate enzimatică reziduală mai crescută, este mai puțin sensibil la variații de pH ale mediului de reacție, are o stabilitate termică mai crescută și prezintă, în sfîrșit, o capacitate de coagulare a laptelui considerabil mai ridicată decît preparatul corespunzător de la cheagul animal.

5. Proprietățile fizico-chimice, mecanice și catalitice ale preparatului enzimatic insolubil obținut de la cheagul microbian deschid perspectiva folosirii lui într-un sistem continuu de coagulare a laptelui în vederea obținerii de brînzeturi.

Prezentat la redacție
la 18 decembrie 1978

Institutul de Științe Biologice
Laboratorul de Enzimologie
București

THE PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF SOME IMMOBILIZED ENZYMES USED IN DAIRY INDUSTRY

SUMMARY

Some methods for the immobilization of animal and microbial rennines using CNBr activated reticulated agarose, and the physico-chemical properties of the bound enzymes are described. The residual proteolytic activity of the immobilized preparations amounted to 42.7% of the original enzymes for the animal rennine and 54.5% for the microbial rennine respectively. The immobilized enzymes showed no change of either their activity or their optimum pH after having been repeatedly used. The immobilized enzymes maintained their ability to coagulate milk. The bound microbial rennine showed physico-chemical and catalytical characteristic far better than those of the bound animal rennine.

BIBLIOGRAFIE

1. E. J. Beckhorn, Biotechnol. & Bioeng. Symp., *3*, 355–359 (1972).
2. H. H. Weetall, Chemiker-Zeitung, **97**, 611 (1973).
3. R. A. Messing, *Immobilized Enzymes for industrial reactors*, Academic Press, New York, San Francisco, London, 1975.

4. C. Alais, A. Lagrange, Le Lait, **517**, 407 (1972).
5. W. F. Line, A. Kwong, H. H. Weetall, Biochim. Biophys. Acta, **242**, 194 (1971).
6. L. K. Ferrier, T. Richardson, N. F. Olson, C. L. Hicks, 66 th Annual Meeting of American Dairy Science Assoc., Michigan State University, June, 1971 citat după H. H. Weetall în *Immobilized enzymes for industrial reactors*, editat de R. A. Messing, Academic Press, New York, San Francisco, London, 1975, p. 207.
7. M. J. Green, G. Crutchfield, Biochem. J., **115**, 183 (1969).
8. H. D. Schell, T. Benția, M.A. Mateescu, Brevet românesc nr. 65382/1977.
9. R. Axén, J. Porath, S. Ernback, Nature, **214**, 1302 (1967).
10. M. Laskowski, în *Methods in enzymology*, vol. 2, p. 32, editat de S. P. Colowick și N. O. Kaplan, Academic Press Inc., Publishers, New York, 1955.
11. M. Dimitriu, *Biochimia produselor alimentare*, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1975.

PURIFICAREA UREAZEI DIN SOIA ÎN SCOPUL UTILIZĂRII EI CA REACTIV PENTRU DETERMINAREA UREEI

MARGARETA ŞERBAN, CEZARINA CUCU, C. VLĂDESCU

Rezumat. S-a izolat din făină de soia, prin extracţii şi precipitări succesive, o proteină activă din punct de vedere enzimatic, respectiv cu conţinut bogat în urează. Această proteină a fost comparată atît în ceea ce priveşte activitatea catalitică, cît şi al gradului de puritate cu ureaza livrată de firma SERVA. Rezultatele obţinute conduc la concluzia că ureaza purificată astfel face posibilă extinderea pe scară largă a practicării tehnicii enzimatice de dozare a ureei în scop diagnostic.

În ansamblul cerinţelor metodologice actuale impuse de dezvoltarea şi diversificarea biochimiei analitice clinice, standardizarea şi uniformizarea metodelor biochimice corelate cu selecţionarea şi aplicarea unor tehnici care să fie expeditive, necostisitoare şi accesibile tuturor laboratoarelor, constituie o necesitate de prim ordin.

Pornind de la aceste deziderate şi ca o continuare a preocupărilor anterioare ale laboratorului nostru, în sensul satisfacerii unor asemenea necesităţi (1) — (5), în această lucrare ne-am propus să obţinem urează purificată dintr-o materie primă indigenă accesibilă — soia — în scopul utilizării ei ca reactiv pentru determinarea ureei. Premisele care au stat la baza efectuării acestei lucrări vizează posibilitatea introducerii şi aplicării metodei de dozare enzimatică a ureei la nivelul tuturor laboratoarelor de biochimie clinică din ţară.

Metoda de purificare a ureazei aleasă de noi n-a urmărit obţinerea unui component cu grad foarte înalt de puritate, aceasta depăşind scopul propus. Am urmărit aplicarea unui procedeu simplu, rapid şi accesibil tuturor laboratoarelor, procedeu prin care să se poată obţine o urează suficient de pură, stabilă şi cu activitate enzimatică comparabilă cu ureaza furnizată de firme străine.

MATERIAL ŞI METODE

Ca sursă bogată în urează, am folosit fasolea soia ; făina respectivă, obţinută după măcinarea boabelor, a fost păstrată la loc uscat, în ambalaj de sticlă sau hîrtie, departe de orice reactiv conţinînd amoniac.

S-au suspendat 100 g făină de soia în 500 ml apă distilată, agitîndu-se din cînd în cînd, timp de două ore, la temperatura camerei. Suspensia a fost lăsată apoi la 4°C pînă a doua zi. Separarea extractului proteic în mediul apos s-a realizat prin centrifugarea suspensiei la 3000—4000 t/min. Cu ajutorul unei hîrtii de filtru s-a îndepărtat cu atenţie stratul lipidic de la suprafaţa cupelor

de centrifugă. Supernatantul a fost apoi decantat şi volumul său măsurat. Într-un vas Erlenmeyer de 1000 ml s-au adăugat apoi pentru fiecare volum de extract apos 10 volume de acetonă. După omogenizarea amestecului, acesta a fost lăsat 24 ore la 4°C pentru o mai bună precipitare. Izolarea precipitatului obţinut s-a făcut prin filtrare în pîlnie Büchner, la trompă de vid. Precipitatul a fost spălat — pe pîlnie — cu acetonă. După uscare, masa proteică obţinută a fost majorată şi păstrată în recipient de sticlă, la 4°C.

O parte din această proteină a fost supusă unei a doua purificări, după tehnica descrisă mai sus.

Ureaza obţinută astfel („P") a fost comparată cu ureaza livrată de firma SERVA (R.F.G.), atît în ceea ce priveşte gradul de puritate, cît şi cel al activităţii ei enzimatice.

Stabilirea gradului de puritate s-a realizat cu ajutorul metodei microelectroforetice, folosind ca suport de migrare gelul de agar Noble-Difco în tampon medinal — HCl, pH=8,6. Pentru determinarea ureei s-a folosit metoda Chaney şi Marbach (6), utilizînd în acest scop autoanalizorul LKB-Ultrolab 7 400.

Studiul comparativ al activităţii enzimatice s-a făcut pe 100 probe de sînge provenind atît de la subiecţi sănătoşi, cît şi de la bolnavi cu grade variate de retenţie azotată. Rezultatele obţinute au fost prelucrate static.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din compararea valorilor ureei sanguine, obţinute prin folosirea în paralel a ureazei purificate în laboratorul nostru („P") cu ureaza furnizată de firma SERVA, rezultă că aceste două surse de enzimă dau rezultate concordante din punctul de vedere al activităţii lor catalitice. Norul de dispersie al acestor valori şi respectiv dreapta de regresie obţinută (fig. 1) subliniază concordanţa acestor rezultate.

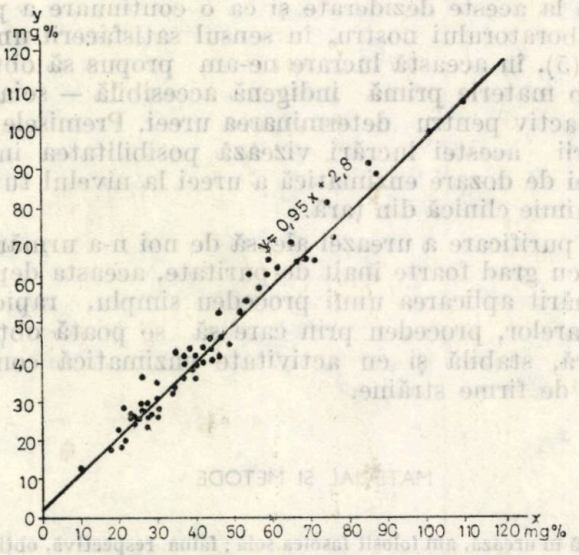


Fig. 1. — Norul de dispersie şi dreapta de regresie obţinută prin compararea celor două surse de urează.

x = ureaza SERVA;
y = ureaza „P".

Pentru stabilirea reproductibilităţii rezultatelor obţinute prin folosirea celor două surse de urează, s-au calculat valorile medii, eroarea standard şi coeficienţii de variaţie (tabela 1).

Tabela 1

Valorile medii, eroarea standard și coeficienții de variație ale metodei enzimatice de determinare a ureei sanguine, pentru cele două surse de urează comparate

Urează / SER	Valoarea mediei mg %	Eroarea standard mg %	Coeficient variație %
Ureaza SERVA / ser normal	27,6	±1,289	±4,67
Ureaza „P" / ser normal	27,5	±1,246	±4,53
Ureaza SERVA / ser patol.	87,9	±2,9	±3,3
Ureaza „P" / ser patol.	84,7	±2,1	±2,4

După cum se poate constata din tabelă, determinarea parametrilor statistici s-a făcut atît pentru o valoare normală de uree sanguină, cît și pentru o valoare patologică. Acești parametri au și într-un caz și în celălalt valori comparabile.

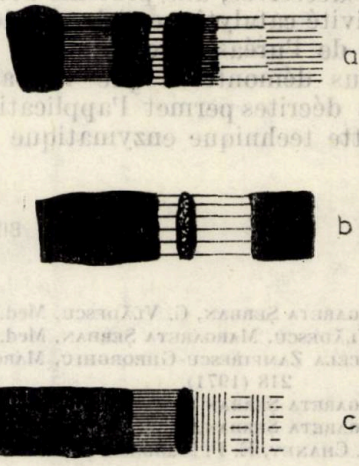


Fig. 2. — Compararea gradelor de puritate proteică a celor două surse de urează. *a* = proteinograma unui ser normal; *b* = modelul proteic al ureazei SERVA; *c* = modelul proteic al ureazei „P".

Gradul de puritate proteică a celor două surse de urează s-a stabilit prin compararea modelelor electroforetice obținute. Din figura 2 se poate

constata că, în timp ce ureaza SERVA are în afara componentei proteice majore, impurităţi în zona de migrare a gamaglobulinelor, ureaza purificată de noi are impurităţi în zona prealbuminică şi a alfa$_2$globulinelor. Procentul de impurităţi, determinat prin densitometrarea modelelor proteice obţinute este de 23—27% pentru ureaza SERVA şi de 10—14% pentru ureaza purificată în laborator.

Ureaza dublu purificată nu prezintă un grad îmbunătăţit de puritate, ceea ce ne-a determinat ca în purificările ulterioare să renunţăm la această etapă.

CONCLUZII

1. Purificarea într-o singură fază de precipitare a ureazei din făina de soia este suficientă pentru folosirea ei ca reactiv în determinarea ureei.

2. Folosind modalităţi tehnice simple şi materie primă foarte accesibilă, există posibilitatea de a obţine urează purificată, comparabilă în ceea ce priveşte activitatea sa catalitică cu produsul de import. În acest fel devine posibilă extinderea pe scară largă a practicării tehnicii enzimatice de dozare a ureei în scop diagnostic.

Prezentat la redacţie
la 20 octombrie 1978

Institutul de Medicină şi Farmacie
şi
Institutul de medicină internă „N. Gh. Lupu"

LA PURIFICATION DE L'URÉASE, EN VUE DE SON UTILISATION COMME RÉACTIF POUR LA DÉTERMINATION DE L'URÉE

RÉSUMÉ

On a isolé de la farine de Soja, par des extractions et des précipitations succesives, une protéine active, douée d'une riche teneur en uréase. L'activité catalytique et la pureté de cette protéine ont été comparées à celles de l'uréase produite par les laboratoires SERVA. Les résultats obtenus démontrent que l'uréase purifiée dans les conditions que nous avons décrites permet l'application générale dans les laboratoires cliniques de cette technique enzymatique pour la détermination de l'urée sérique.

BIBLIOGRAFIE

1. Margareta Şerban, C. Vlădescu, Med. Int., **29**, 557 (1977).
2. C. Vlădescu, Margareta Şerban, Med. Int., **28**, 459 (1976).
3. Marcela Zamfirescu-Gheorghiu, Margareta Şerban, C. Vlădescu, Şt. Cerc. Med. Int., **13**, 218 (1971).
4. Margareta Şerban, I. Bruckner, Cezarina Cucu, Med. Int., **4**, 479 (1974).
5. Margareta Şerban, Marcela Zamfirescu-Gheorghiu, St. Cerc. Med. Int., **14**, 161 (1973).
6. A. I. Chaney, E. P. Marbach, Clin. Chem., **8**, 130 (1962).

RECENZII

R. HASCHEN, D. SCHEUCH, *Abriss der pathologischen Biochemie* (Scurtă expunere a biochimiei patologice), Editura VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1978, 188 p., 51 fig., 48 Tab., DDR M 23,70

Biochimia patologică a devenit — pe lîngă biochimia clinică — o disciplină deosebit de importantă şi utilă pentru medicină, întrucît în prezent un număr din ce în ce mai mare de boli pot fi interpretate în bună parte, sau chiar exclusiv, numai prin aspecte biochimice ale procesului patologic. Biochimia patologică descrie şi cercetează mai ales dereglările biochimice ale proceselor metabolice în cadrul diferitelor boli, cauzele acestora, precum şi repercusiunile lor asupra întregului organism. Ea cercetează compoziţia chimică a organismului, organelor, celulelor, formaţiunilor celulare, tumorilor la om în condiţii patologice. Biochimia patologică contribuie împreună cu alte domenii de specialitate la măsurile profilactice şi curative.

Prezenta carte, scrisă pentru învăţămîntul superior de specialitate, prezintă în mod succint, după o introducere referitoare la noţiuni elementare şi fixare a domeniului, mai întîi bazele moleculare ale dereglărilor metabolice, apoi aspecte legate de malnutriţie, maldigestie şi malresorbţie. Sînt tratate apoi în continuare dereglările regimului hidric, electrolitic şi ale echilibrului acido-bazic. Un capitol este consacrat reglării endocrine perturbate. Urmează apoi capitole referitoare la patobiochimia sistemului cardiovascular, a ficatului, rinichilor şi a apărării imune. Capitole privitoare la hemostaza perturbată, creşterea malignă şi acţiunea radiaţiilor încheie această carte valoroasă, foarte sistematic prezentată, bogată în figuri, scheme şi tabele.

Horst D. Schell

L. NOVER, M. LUCKNER, B. PARTHIER, *Zelldifferenzierung. Molekulare Grundlagen und Probleme* (Diferenţiere celulară. Baze moleculare şi probleme), Editura VEB, Gustav Fischer Verlag, Jena, 1978, 582 p., 162 fig., 31 Tab., DDR M 68.

Diferenţierea celulară reprezintă una din problemele centrale ale biologiei generale cu implicaţii directe în medicină, agricultură şi microbiologie industrială.

Prezenta carte încearcă să arate pe baza unui bogat material faptic acumulat în anii din urmă cum se ajunge la diferenţierea celulară, proces în cadrul căruia un loc de frunte îl ocupă proteinele.

Cartea cuprinde trei părţi. După un capitol introductiv în care se explică terminologia de bază, specifică acestui domeniu, şi în care se face o scurtă prezentare a biochimiei expresiei genice, urmează o parte generală în centrul căreia stă — după o succintă prezentare a istoricului noţiunii de diferenţiere — încercarea de a da o imagine unitară a bazelor moleculare ale diferenţierii celulare sprijinită pe datele experimentale obţinute pe diferite tipuri de organisme. În partea a treia, specială, în sfîrşit, se tratează în mod amănunţit diferitele sisteme experimentale adecvate pentru o reprezentare detaliată a diferitelor aspecte de diferenţiere celulară. Astfel, sînt tratate pe rînd aspecte ca : reglarea sintezei adaptive de enzime la procariote, transformarea fotoindusă a proteoplastidelor în cloroplaste la alge şi plante superioare, adaptarea proteinelor în celula animală sub influenţa estradiolului, izoenzimele şi diferenţierea, formarea metabolismului secundar ca un aspect al specializării celulare, biosinteza şi acumularea de proteine de rezervă în cursul maturizării seminţelor la plante, diferenţierea la formarea şi funcţionarea sistemului imun, programele de expresie genică codificată de fagi în celulele de *E. coli*, ciclul de diviziune celulară ca program de expresie genică, reglarea morfogenezei la *Acetabularia*

diferențierea celulară și starea de tumoare la tumori vegetali de tip Crown-Gall, programul de evoluție la *Dictyostelium discoideum*.

Cartea bogat ilustrată se adresează mai ales biologilor, biochimiștilor, microbiologilor, medicilor, agronomilor și altor specialiști care se văd confruntați cu probleme de diferențiere celulară. Cartea avînd aspectul de manual, se adresează în egală măsură și studenților, oferind posibilitatea unei familiarizări avansate cu problematica acestui domeniu extrem de actual. Literatura de specialitate bine aleasă și sistematizată pe domenii, de la fiecare sfîrșit de capitol, vine în ajutorul celor interesați care doresc să aprofundeze anumite aspecte mai speciale.

Un index pe subiecte încheie această carte utilă și de mare actualitate.

Horst D. Schell

IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF THE CARCINOGENIC RISK OF CHEMICALS TO MAN. Some Aromatic Amines and Related Nitro Compounds — Hair Dyes, Colouring Agents and Miscellaneous Industrial Chemicals (Monografiile IARC asupra evaluării riscului carcinogenic la om. Unele amine aromatice și compuși nitro înrudiți — Coloranți pentru păr, agenți de colorare și diferite substanțe industriale). Volume 16. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1978, 400 p., $ 20.

Volumul de față reprezintă opiniile Grupului de lucru IARC (Lyon, 7—14 iunie 1977) și cumulează prezentările din punct de vedere fizico-chimic, analitic, fiziologic și, îndeosebi, al riscului carcinogenic la om, — ale unor compuși aromatici de structuri diverse, care nu au fost incluși în monografiile anterioare. Totuși, se adoptă o clasificare utilă practic, în sensul că se discută în aceleași secțiuni coloranți ai părului (cu aplicații în cosmetică) și diverși coloranți industriali. Deoarece mulți dintre acești compuși sînt utilizați în amestecuri, nu totdeauna a fost posibilă o evaluare riguroasă a riscului carcinogenic. De asemenea sînt menționate substanțe aromatice, în atenția specialiștilor, neincluse deocamdată în monografiile IARC, datorită datelor incomplete.

Printre compușii indexați se află coloranți temporari ai părului (benzil violet 4B), semipermanenți și permanenți (substanțe diamino-nitro-benzenice), cu structuri în general comune, dar cu adaosul unui agent oxidant pentru coloranții permanenți.

Dintre substanțele cu importanță industrială, sînt trecuți în revistă agenți dezinfectanți (5-amino-acenaftenul), intermediari în sinteza unor coloranți și pigmenți (acid antranilic, *p*-clor, o-toluidină), reactivi analitici (2,4-difenil-amină), medicamente (acid *p*-amino-benzoic), ingrediente alimentare aromatizante (cinamil-antranilat) și adjuvanți la polimeri sintetici și cauciuc (4,4'-diaminodifenil-eter, N-fenil-2-naftil-amină).

Vl. Gheordunescu

ENVIRONMENTAL CARCINOGENS SELECTED METHODS OF ANALYSIS. VOLUME 1 — *ANALYSIS OF VOLATILE NITROSAMINES IN FOOD* (Carcinogene din mediul înconjurător. Metode speciale de analiză. Volumul 1 — Analiza nitrozaminelor volatile în alimente). IARC Scientific Publications No. 18. International Agency for Research on Cancer. Lyon, 1978, 212 p., $ 45.

În volumul de față se abordează din nou în cuprinsul seriei, studiul analitic al N-nitrozocompușilor.

Argumentul volumului este concretizat într-o scurtă prezentare privind carcinogenicitatea acestor substanțe și rolul lor posibil în cancerul uman.

Secțiunea următoare cuprinde treceri în revistă a metodologiilor de abordare din punct de vedere analitic, utilizîndu-se tehnici moderne, printre care spectrometria de masă, chemoluminiscența etc. Ca și în celelalte volume ale seriei consacrate acestui domeniu se acordă importanță și determinării de nitrați și nitriți, substanțe care intervin în studiul nitrozaminelor.

Ultima secțiune abordează determinarea propriu-zisă a acestor compuși, descriind procedeele respective în cazuri concrete — în alimente, îndeosebi în produse de carne. Printre aceste metode : cromatografie în gaze cu detector Coulson, chemiluminiscența combinată cu termoanaliza, detectarea prin captură de electroni etc.

Vl. Gheordunescu

DIRECTORY OF ON-GOING RESEARCH IN CANCER EPIDEMIOLOGY. 1978 (Indexul cercetărilor actuale în epidemiologia cancerului. 1978). C. S. Muir & G. Wagner, eds. IARC Scientific Publications No. 26. International Agency for Research on Cancer & Deutsches Krebsforschungszentrum. Lyon, 1978, 550 p. Sw. fr. 50.—

Acest al treilea volum de informare conține date asupra 1 025 proiecte de cercetare în curs, din 73 de țări, cu 13 % mai multe decît în 1976. Interesul crescînd al cercetătorilor din toată lumea față de relația dintre mediul înconjurător și cancerul la om — a condus Agenția Internațională pentru Cercetarea Cancerului și Centrul German de Cercetarea Cancerului, la înființarea unei Bănci de Date ale Cercetării Actuale în Epidemiologia Cancerului (Clearing-House for Ongoing Research in Cancer Epidemiology).

In introducere se descriu criteriile care stau la baza activității acestei Bănci de Date (înființată în 1975), privind editarea unor asemenea index-uri și se menționează relațiile cu alte organisme internaționale, care se ocupă de alte aspecte, în afară de cel epidemiologic, ale bolii canceroase.

Prima secțiune este rezervată listei proiectelor. Fiecare proiect cuprinde, în afară de numele autorilor și adresa lor, ideile de bază și scopul cercetării, de asemenea cuvintele-cheie — care servesc indexului pe subiecte — organele anatomice vizate, spațiul geografic de unde s-au colectat datele și intervalul de timp respectiv. Celelalte secțiuni ale volumului sînt de fapt index-uri care privesc : cercetătorii ; organele anatomice afectate ; termenii folosiți ; substanțele chimice cu risk carcinogenic ; tipurile de studii (metodologiile de abordare) ; țările unde se întreprind asemenea studii și centrele naționale de evidență a cancerului.

Vl. Gheordunescu

ADVANCES IN ANATOMY, EMBRIOLOGY AND CELL BIOLOGY. The Differentiation of Rat Ova During Cleavage (Progrese în anatomie, embriologie și biologie celulară. Diferențierea oului de șobolan în cursul diviziunii) Vol. 55, Fasc. 2, de M. Dvorák ; Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1978, 131 p., 62 fig., $ 32.

Lucrarea de față este de fapt un studiu model al diviziunii oului, începînd din momentul imediat următor fecundării. Evident, fiind vorba de o chestiune de o asemenea importanță, era necesară o tratare statistică pe un mare număr de cazuri. Autorul a folosit în acest scop un număr impresionant de ouă de șobolan : 2500 (rasa Rattus norvegicus var. alba). Materialul constitutiv al volumului este structurat pe două secțiuni principale, intitulate : *Structura submicroscopică și ultracitochimia ouălelor de șobolan în segmentare* și *Relații morfologice și funcționale în decursul diviziunii ouălelor de mamifere*.

În primul capitol sînt prezentate ouă mono-, di-, tetra- și octocelulare, care sînt analizate din toate punctele de vedere (structură, submicroscopică, ultracitochimie, metabolism etc.) pentru cele mai importante structuri și organite : nucleu, citoplasmă, zona pellucida etc. Urmînd criteriul vîrstei, sînt prezentate apoi morulele de șobolan (stadiul 16—24 celule), blastocitele timpurii și blastocitele tîrzii. Și pentru aceste formațiuni se folosește schema de studiu de mai sus, în sensul că sînt prezentate din punctele de vedere amintite : nucleul (cu membrana nucleară, cromatina și nucleolul) și citoplasma (cu mitocondrii, corpi multiveziculari, vacuole autofage, corpi reziduali, reticul endoplasmic granular, reticul endoplasmic neted, ribozomi, aparat Golgi, centrioli, structuri lamelare, particole de glicogen, picături de lipide, membrană celulară și granulații corticale). Pentru blastocitele timpurii și cele tîrzii sînt prezentate celulele embrioblastice, trofoblastice și zona pellucida. Capitolul ia sfîrșit cu un subcapitol cuprinzînd unele din cele mai importante concluzii (referitoare la evoluția nucleului, mitocondriilor, aparatului Golgi și a membranei celulare) pentru diviziunea oului fecundat. Se subliniază că aceste transformări sînt expresia fenotipică a diferențierii care urmează fecundației.

Cel de-al doilea capitol, mai redus ca întindere, conține un număr relativ mai restrîns de date morfologice, avînd în schimb mai multe date biochimice și fiziologice (funcționale — cum le numește autorul). Din acest motiv, deși ambele capitole sînt deosebit de ordonat expuse, cel de-al doilea apare ca mult mai condensat. Sînt studiate în primul rînd membranele celulare și ale formațiunilor pluricelulare, precum și structurile de joncțiune dintre celulele în diviziune. Sînt de asemenea prezentate aspecte privind evoluția acizilor nucleici în decursul segmentării.

Mihai Zamfir-Grigorescu

H. W. Kölmel, *LIQUORZYTOLOGIE*, Atlas al celulelor lichidului cerebrospinal, — Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1978, 150 p., 54 fig., 49 $.

Cartea de față este un atlas de citologie referitor la celulele din lichidul cerebrospinal, un domeniu în care s-au publicat puține lucrări pînă în prezent. Însăși tehnica folosită este una nouă și de mari perspective din punctul de vedere al diagnosticului neurologic.

În primul capitol sînt amănunțit prezentate tehnicile folosite în preparare și colorare, cu numeroase indicații bibliografice și rețete ale coloranților. În următoarele capitole sînt prezentate imagini, de celule ale lichidului cerebospinal normal, celule ale sistemelor fagocitare mononucleare, granulocite eorinofile, meningită bacterială, meningită limfocitară, meningoencefalita tuberculoasă, meningo encefalita în boala lui Behcetocher, celule gigant, celule tumorale, metastaze, leucemie, limfom malign.

Imaginile sînt însoțite de comentariul autorului care în expunerea materialului se sprijină pe numeroase publicații de interes pentru domeniu. Cartea se încheie cu o listă bibliografică care cuprinde 238 titluri precum și un index tematic.

Cartea de față este de mare ajutor în neurocitologie fiind dealtfel printre primele lucrări de citologie a lichidului cerebrospinal.

Angel Gabriela

Flexibile Taschenbücher — K. Beyermann — *Chemie für Mediziner* (Chimie pentru studenți în medicină) ; Georg Thieme Stuttgart, 1976, 406 p., 66 fig., 20 tabele.

Cartea de față prezentată în formă de manual, oferă cunoștințe de bază de chimie studenților la medicină. Autorul a căutat ca la această a patra ediție, cartea să capete o formă cît mai atractivă și convingătoare pentru studenți, lucrarea debutînd cu o trecere în revistă a conexiunilor dintre chimie și medicină. Cele 14 capitole ale cărții tratează probleme fundamentale ale structurii materiei, începînd cu structura atomului, moleculelor, combinațiilor ionice ; probleme ale reacțiilor, reactivității chimice, echilibrului chimic ; probleme ale chimiei organice și biochimiei.

Materialul însoțit de numeroase figuri și schițe explicative este întregit de 1 210 întrebări și probleme menite să ajute la fixarea noțiunilor însușite din prezentul manual. Remarcăm stilul concis și clar al autorului, manualul fiind de mare ajutor pentru studenții nechimiști. Anumite capitole ale chimiei nu sînt luate în discuție, ex. : radiochimie, chimie analitică, deși ele sînt de interes pentru „mediciniști".

Cartea se încheie cu un index tematic și o listă bibliografică cu lucrări clasice în domenii ale chimiei generale, fizicii, biochimiei, farmacologiei.

Angel Gabriela

Ergebnisse der experimentellen Medicin Vol. 32, K. Lohmann, *STAND UND FORTSCHRITTE DER METHODEN IN DER EXPERIMENTELLEN MEDIZIN*. (Etapa prezentă și dezvoltarea metodelor experimentale în medicină), VEB Verlag Volk und Gesundheit Berlin, 1978, 120 p., 76 fig., 26 tabele, 29 DDRM

Cartea de față redactată sub îngrijirea prof. L. Lohmann (Berlin, RDG) cuprinde o utilă trecere în revistă a celor mai recente achiziții cu privire la metodele experimentale utilizate în practica și cercetarea medicală. Cartea este o sumă de 21 de referate din domenii ca biochimie, histochimie, imunologie, culturi de celule, explorări funcționale, metode fizice de diagnostic, biotelemetrie.

Prezentul volum al seriei de medicină experimentală al editurii „Volk und Gesundheit Berlin" este prezentat într-o formă nouă, parte din materialul prezentat fiind cuprins pe microfișe ce însoțesc cartea. Referatele sînt în general scurte fiind însoțite de un bogat material ilustrativ sub formă de fotografii și scheme.

Redactarea cărții s-a făcut în ideea unei abordări interdisciplinare și facilitării comunicării dintre diverși specialiști în condițiile în care diferențierea dintre înșeși subramurile unor discipline a devenit atît de pronunțată, cu un arsenal propriu de tehnici de lucru și limbaj de specialitate.

Prezentul volum include în acest spirit informația referitoare la structuri și procese biologice de la molecular la organice și organe. Astfel primul capitol, care însumează patru referate, se referă la separarea organitelor celulare, izolarea și caracterizarea mitocondriilor, lizozomilor și sinaptozomilor din creier. Capitolul doi cuprinde trei referate cu privire la separarea proteinelor, acizilor nucleici și aminoacizilor. Capitolul trei consacrat metodelor fizice de investigare în practica medicală, cuprinde trei referate cu privire la ultrasunete, tomografie și metode fizice în biologia moleculară. Capitolul următor referitor la culturi celulare cuprinde trei referate cu privire la importanța culturilor din punct de vedere al diagnosticului și terapiei medicale, cultivarea celulelor mușchiului inimii și celule fibroblastoide. Capitolul cinci cuprinde două referate de histochimie respectiv imunologie. Capitolul șase cuprinde două referate de chimie clinică și farmacologie (diagnostic enzimatic). Următorul capitol, compus din două referate, tratează probleme de biotelemetrie. Ultimul capitol cuprinde două referate de fiziologie aplicată.

Cartea se încheie cu un index pe subiecte și o listă cu adresele autorilor, editura invitînd la un schimb de opinii între autori-cititori.

Angel Gabriela

GLUTATHIONE, editat de L. Flöhe și colab., Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1974, 316 p., 187 fig., 45 tabele, 64 DM.

Glutathione însumează lucrările din domeniul biosintezei, catabolismului și funcțiilor glutationului prezentat cu ocazia celei de a 16-a conferințe a Societății Germane de Chimie Biologică ținută la Tübingen, R. F. Germania, în martie 1973. Editorii, în număr de cinci, în frunte cu L. Flöhe și H. Ch. Benhohr, fac parte din complexul de institute medicale cu sediul la Tübingen, în special Institutul de Chimie Fiziologică al Universității din același oraș. Conferința a cuprins 32 de lucrări la care au participat 48 cercetători din 7 țări.

Acest simpozion, al treilea cu același subiect după cele ținute în 1953 la Ridgefield și în 1958 la Londra ilustrează interesul pe care îl produc lucrările asupra acestui tripeptid. De la precedentele simpozioane s-au acumulat numeroase informații asupra unor noi aspecte ale funcțiilor multiple ale glutationului, în special descoperirea a trei noi clase de enzime ce folosesc GSH drept coenzimă : glutation-S-transferaze, disulfuri mixte-reductaze și glutation-peroxidază. Un accent deosebit al acestui simpozion a fost posibilitatea unor discuții între fizico-chimiști, biochimiști și clinicieni. În consecință lucrările prezentate au avut un profil larg cuprinzînd studii cu tehnici avansate ca rezonanța magnetică nucleară aplicată la GSH marcat cu C^{13} în vederea calculării echilibrului de disociație, dicroism circular, transfer de protoni intramolecular etc.

Lucrările prezentate au fost împărțite în șase secții. Prima, cuprinde un număr de trei lucrări despre proprietățile fizicochimice ale compușilor tiolici și disulfurilor, în care GSH este comparat cu ceilalți compuși înrudiți, mai ales ca proprietăți redox.

A doua secție cuprinde de asemenea un număr de trei lucrări despre reacții model ale compușilor tiolici, cum ar fi reacții de interschimb $SH \rightleftharpoons SS$, complecși metalici de tranziție, importanța grupărilor SH în fosforilarea oxidativă, în care E. Bauerlein prezintă un studiu deosebit de interesant asupra reacțiilor în care tiolii influențează acest proces.

Biosinteza și utilizarea glutationului formează a treia secție cuprinzînd două lucrări despre biosinteza GSH (Meister și Wendel) aspectul ciclului γ-glutamil și al biosintezei în hematie. Cercetătorii suedezi în special B. Mannervik prezintă mecanismele enzimatice ale unor enzime ce folosesc GSH drept coenzimă: glioxalază, transferaze, reductaze și peroxidază, reducerea disulfurilor fiind problema cea mai discutată.

Aspectele clinice ale deficitului metabolismului glutationului formează a patra secție. Remarcăm studiile asupra deficiențelor în biosinteza GSH (Boivin), reducerea glutationului oxidat (Lohr și Benohr) și a GSH-peroxidazei (Necheles și Gunzler). Pe lîngă aspectele clinice mai sînt prezentate lucrări asupra reglării nivelului GSH în hematie și în cristalin. Funcția protectoare a GSH față de acțiunea oxidantă este studiată de Aebi și Suter în hematie.

A cincea secție cuprinde studii asupra rolului protector al glutationului față de oxidanți în cadrul menținerii integrității membranelor. În cele cinci lucrări sînt cuprinse diferitele aspecte ale protecției GSH și a altor compuși tiolici față de radiații ionizante (Rink), formării metabolice a H_2O_2 în mitocondrie și implicațiile structurale, funcționale și energetice (Flöhe și colaboratorii).

Rolul glutationului în cadrul funcțiilor celulare cuprinde trei lucrări de amploare despre formarea peroxizilor în ficat (Flöhe și colaboratori iar soții Kosower prezintă două lucrări despre efectul glutationului oxidat asupra sintezei proteice și modificărilor echilibrului $GSH \rightleftharpoons GSSG$ în sisteme biologice.

Întreg ansamblu de lucrări aduce noi și valoroase informații asupra unui domeniu mai puțin cunoscut, a cărui importanță crește necontenit prin descoperirea unor noi implicații și interrelații mai ales ale unor sisteme enzimatice.

Radu Olinescu

IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUTION OF THE CARCINOGENIC RISK OF CHEMICALS TO HUMANS. Some N-Nitroso Compounds/Monografiile IARC de evaluare a riscului carcinogenic al substanțelor chimice la oameni. Unii compuși N-nitrozo/ Volume 17. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1978, 365 p., 25 $

Acesta este al treilea volum din serie, consacrat substanțelor cu gruparea =N—NO și reprezintă opiniile specialiștilor din grupul de lucru al IARC, întruniți la Lyon, între 10—15 octombrie 1977.

Printre compușii indexați, unii prezintă importanță industrială în sinteza chimică (N-nitrozodi-n-butilamină, N-nitrozo-N-etiluree, etc.), alții sînt solvenți (N-nitrozo-morfolină) sau substanțe cu acțiune bactericidă (N-nitrozo-morfolina, streptozotocina — acesta fiind produs și de un microorganism din sol, Streptomyces achromogenes). O parte dintre aceste substanțe se folosesc ca agenți mutageni pentru microorganisme (N-nitrozodietilamina) sau pentru plante (N-nitrozo-N-etiluree).

Prin metode foarte fine de analiză s-au putut detecta aceste substanțe în aer, apă, sol, fum de țigară, diferite alimente, băuturi alcoolice, de asemenea în medicamente sau în pesticide N-nitrozo-dietil și dimetil-amina au fost detectate și în organismul uman, ca urmare a ingerării unor alimente.

În afara evaluării riscului carcinogenic al acestor compuși, apariția și implicațiile lor multiple recomandă cu deosebire acest volum atenției specialiștilor.

Vl. Gheordunescu

ENVIRONMENTAL ASPECTS OF N-NITROSO COMPOUNDS (Probleme ale relației dintre compușii N-nitrozo- și mediul înconjurător) IARC Scientific Publications No. 19. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1978, 566 p., 50 $.

Acesta este al cincilea volum din serie, consacrat analizei, formării și incidenței în mediul înconjurător al compușilor N-nitrozo,- și reprezintă lucrările Conferinței de perfecționare a specialiștilor în domeniu care a avut loc la Durham., SUA, între 22 — 24 august 1977.

Au fost abordate următoarele domenii :

— determinarea prin mijloace moderne a compușilor N-nitrozo, dintre care citâm termoanaliza combinată cu cromatografia la presiune înaltă în lichide, cromatografia în strat subțire etc. ;

— sinteza în laborator și biosinteza acestor compuși, factori care influențează procesele respective ;

— interferența cu substanțe de importanță fiziologică ;

— apariția în organism și în mediul înconjurător ;

— metode de protecție a organismului.

De la prima lectură a volumului se observă că aspectele abordate sînt foarte diverse și sînt în atenția a numeroși specialiști : chimiști, biologi, medici, farmaciști.

Vl. Gheordunescu

J. Segal, *BIOPHYSIKALISCHE ASPECTE DER ELEMENTAREN ZELLFUNKTIONEN* (Aspecte biofizice ale funcțiilor celulare elementare), VEB Georg Thieme Leipzig, 1978, 241 pg., 105 fig., 39 MDDR

Cartea de față, cea mai recentă lucrare a profesorului Jacob Segal (RDG) este o scurtă monografie referitoare la funcțiile celulare elementare avînd în vedere cunoștințele actuale de biofizică referitoare la membrane și proteine. Cartea oferă deci o tratare așezată pe noi baze

conceptuale în care evenimentul biofizic capătă un rol important în raport cu desfășurarea funcțiilor celulare, cel puțin cele elementare. Această regîndire a unor aspecte ale fiziologiei celulare este de fapt o necesitate avînd în vedere însemnatele progrese ce s-au făcut în domeniul biofizicii proteinelor și membranelor, interacțiilor de schimb dintre proteine și molecule din mediu, problemelor de structură spațială sub raportul relației structură-funcție. Comparația dintre înțelegerea veche și nouă este făcută explicit în anumite probleme (exemplu : forma clasică-forma nouă a teoriei membranelor).

La baza numeroaselor funcții celulare stă excitabilitatea. Autorul consacră șase capitole excitabilității avînd în vedere tocmai deosebita ei importanță. După un capitol introductiv referitor la excitabilitate în general, se consacră cîte un capitol aparte tratării problemelor celulei în repaus, potențialului de acțiune, teoriei fazelor, fizicochimiei proceselor de excitație și excitabilității intracelulare. Pe parcursul expunerii sînt inserate teoriile biofizice care au fost cel mai larg acceptate dobîndind cea mai mare popularitate.

Capitolele următoare abordează din alte direcții funcțiile celulare tratînd probleme ale reglării proceselor biochimice cu modificările sale patologice inclusiv problema cancerului.

Ultimele capitole se ocupă de forme de mișcare și proprietăți mecanice ale celulei în general, ale mușchiului în particular. Luînd în discuție contracția musculară, autorul atinge succint toate problemele legate de acest complex proces uzînd de numeroase indicații bibliografice dintre cele mai recente.

Capitolul final al cărții este consacrat diviziunii mitotice. Remarcăm tratarea concisă și de înalt nivel a materialului. Parcurgerea cărții presupune cunoașterea termenilor de specialitate și însuși a domeniului fiind vorba de reevaluarea unor imagini de acum învechite referitoare la funcțiile celulare elementare.

Scopul declarat al autorului este de a formula o prezentare unitară a diferitelor forme de activitate celulară.

Cartea este însoțită de un bogat material grafic adesea preluat chiar din publicațiile citate. În final cartea cuprinde o bogată listă de indicații bibliografice cuprinzînd atît lucrări clasice cît și publicațiile cele mai recente, de interes pentru problematica tratată.

Gabriela Angel

E. GÜNTHER, *Grundriss der Genetik* (Elemente de genetică), VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1978, Ediția a 3-a, 314 fig., 8 planșe, 55 tabele, 504 p., 1978, 53 DDRM.

Volumul de față se adresează studenților facultăților de biologie, medicină și agronomie oferind o privire de ansamblu asupra noțiunilor de bază ale domeniului, precum și cercetărilor de ultimă oră, privind genetica moleculară, studierea modului de acțiune al genelor, producerii mutațiilor, recombinărilor etc. Iconografia reprezentată prin numeroase grafice, scheme de reacții, planșe și tabele însoțește un text de înaltă ținută științifică și didactică, prezentat clar și deosebit de sistematic.

Din cuprinsul cărții spicuim următoarele : după prezentarea componentelor și proceselor esențiale care stau la baza fenomenelor ereditare, sînt evidențiate principalele tipuri de mutații (la nivelul genelor, cromozomilor și de ploidie) și recombinările inter- și intra-cromozomiale. Un capitol aparte este afectat recombinărilor corelate cu procesele parasexuale. Date interesante sînt cuprinse de asemenea și în capitolele privitoare la genetica populațiilor și la utilizarea datelor acestui domeniu în probleme de creștere a plantelor și animalelor. Ultimele pagini ale cărții cuprind noțiuni de imunogenetică.

Documentația deosebit de bogată — reprezentată de 522 indicații bibliografice — lărgește posibilitățile de informare ale cititorului acestui adevărat tratat de referință pentru genetica actuală.

Lucia-Doina Popov

S. M. RAPOPORT, *Medizinische Biochemie. Lehrbuch für Studierende und Arzte.* (Biochimie medicală. Manual pentru studenți și medici). Editura VEB Volk und Gesundheit, Berlin, 1977, ediția a 7-a, revizuită și completată, 197 figuri, 160 tabele, 1028 pagini ; 53 DDR M.

Bazat pe o bogată experiență didactică, autorul se adresează în prezentul manual mai ales studenților în medicină și medicilor, considerînd biochimia modernă o bază a medicinei teoretice și totodată o componentă esențială cu o importanță deosebită pentru practica clinică.

Dezvoltarea rapidă a biochimiei în ultimii ani a făcut necesară o revizuire a materialului prezentat în ediţiile anterioare. Astfel, în ediţia a 7-a au fost rescrise capitolele privitoare la proteine, enzime, topochimie, aproape toate capitolele referitoare la metabolismul intermediar, dar mai ales oxidarea biologică, metabolismul lipidelor şi al hidraţilor de carbon, sinteza acizilor nucleici şi a proteinelor, precum şi bazele biochimice ale eredităţii. Au fost refăcute de asemenea şi majoritatea capitolelor biochimiei funcţionale şi anume cele privitoare la transportul prin membrane, digestia, musculatura, ţesutul conjunctiv, creierul şi nervii şi imunochimia. S-a concentrat capitolul despre metabolismul general şi alimentaţia, introducîndu-se însă în acelaşi timp probleme actuale ale alimentaţiei, mai ales cele legate de hiperalimentare.

Autorul a renunţat la împărţirea clasică a materialului în biochimia descriptivă şi dinamică şi prezintă vastul material grupat pe patru părţi şi anume : compoziţia şi dinamica sistemelor vii, metabolismul intermediar, biochimia funcţională şi metabolismul general şi alimentaţia.

Capitolele sînt legate logic între ele, scrise clar şi prevăzute cu numeroase tabele, mecanisme de reacţii şi reprezentări schematice deosebit de utile şi sugestive.

Fiecare capitol se încheie cu o serie de întrebări care oferă posibilitatea verificării cunoştinţelor însuşite.

Manualul cuprinde un capitol separat de indicaţii bibliografice deosebit de valoroase pentru cel care doreşte să aprofundeze literatura originală de specialitate (26 pagini). Astfel, în prima parte a acestui capitol sînt indicate cele mai importante reviste şi tratate legate de biochimie, iar în partea a II-a sînt centralizate pe capitole cuprinse în manual cele mai reprezentative tratate şi lucrări din literatura de specialitate pentru domeniul respectiv.

Deosebit de util pentru cadrele didactice de specialitate poate fi planul tematic de prelegeri şi seminarii cu împărţirea pe ore de curs şi seminarii a materialului cuprins în prezentul manual.

Manualul mai conţine un index de prescurtări folosite în literatura de biochimie precum şi sistemul internaţional al unităţilor de măsură.

Manualul se încheie cu un amănunţit index alfabetic pe subiecte şi cu 14 pagini de reproduceri fotografice.

Horst D. Schell

Praktische Biochemie, Grundlagen und Techniken (Principii şi tehnici de biochimie practică) de Bryan L. Williams şi Keith Wilson, Editura Georg Tieme, Stuttgart, 1978, 270 p., 75 fig., 23 tab., 19,8 DM.

Volumul de faţă face parte dintr-o categorie foarte utilă asupra căreia Editura Georg Thieme s-a orientat mai de mult, apropiindu-se cu multă înţelegere de necesităţile tot mai mari ale omului de laborator care lucrează în biochimie, un tip de cercetător a cărui muncă necesită în permanenţă preocupare pentru precizie, selectarea severă a semnificativului şi mai ales eficienţă. Lucrarea îşi declară mobiluri foarte modeste, însă aceasta este numai o chestiune de aparenţe deoarece deşi anunţă intenţia de a prezenta principii şi tehnici de biochimie, lectura cărţii demonstrează că s-au prezentat cele mai importante şi aceasta s-a făcut fără a se renunţa la nimic din ce ar fi folositor, fără a dezvolta ceva mai mult decît este necesar.

Materialul este deosebit de condensat (8 capitole în 260) şi foarte clar şi concis exprimat avînd totodată şi un număr suficient de elemente ilustrative. Acestea sînt selectate cu o grijă exemplară şi utilitatea lor este indiscutabilă. Ceva mai mult, ar fi bine să reţinem preocuparea autorilor de a crea un cît mai direct şi mai rapid acces al cititorului la materialul prezentat. Acest fapt mai este demonstrat şi de existenţa unei liste de abreviaţiuni şi a cîtorva tabele la începutul volumului (cuprinzînd principalele unităţi întrebuinţate). Indexul de la sfîrşitul volumului constituie chiar şi numai el singur o demonstraţie în acest sens. Primul capitol, consacrat generalităţilor conţine nu mai puţin de 11 probleme mai importante dintre care citäm : pH-ul şi tampoanele, importanţa pH-ului pentru procesele biologice, soluţii izotone, perfuzia organelor izolate, manevrarea materialelor vegetale etc. Capitolul secund *Tehnici de centrifugare*, epuizează practic toate procedeele de centrifugare, prezentînd şi dispozitivele corespunzătoare împreună cu modul lor de folosire inclusiv eventualele calcule. Cu toate acestea lectura sa este lejeră şi nu solicită eforturi de concentrare. Capitolul al treilea *Tehnici cromatografice*, prezintă cele mai practice variante ale principalelor tehnici de cromatografie. Pentru fiecare tehnică se dau : principiul, o analiză a factorilor celor mai importanţi care o influenţează, practica metodei, interpretarea rezultatelor şi discuţia critică a posibilităţilor tehnicii. Cromatografia de absorbţie, în strat subţire, pe hîrtie, pe schimbători de ioni etc. sînt numai cîteva exemple de tehnici de acest fel

prezentate. Capitolul al patrulea *Tehnici electroforetice*, prezintă printre altele și unele tehnici de un interes cu totul deosebit, cum ar fi imunoelectroforeza, izoelectrofocusingul, izotacoforeza etc. Expunerea este și în acest capitol pe măsura cerințelor și capitolul se încheie cu o discuție utilă. Capitolul al cincilea *Tehnici spectroscopice*, prezintă la început o introducere generală asupra chestiunilor de principiu ale spectroscopiei, după care se trece la descrierea practicii celor mai importante tipuri de tehnici spectroscopice, cum ar fi : spectrofotometria în u. v., spectrofluorimetria, spectrofotometria în i. r., spectroscopia Raman, flamfotometria R. M. N., R. E. S., etc. Ultimele trei capitole intitulate : *Tehnici radioizitopice Tehnici potențiometrice, electrometrice și polarografice* și *Tehnici manometrice*, dau lucrării un firesc aspect de lucru bine făcut acoperind domenii fără de care cercetarea biochimică nu se poate concepe. Cercetătorii din domeniul biochimiei sînt beneficiarii primi ai lecturii acestei excelente lucrări. Ea poate fi însă consultată cu mult folos și de alții dintre care în primul rînd biologii.

Mihai Zamfir-Grigorescu

Grundlagen der Biochemie 1, Biochemische Reaktionen (Bazele biochimiei 1, Reacții biochimice) și *Grundlagen der Biochemie 11, Stoffwechsel der Organismen* (Bazele biochimiei 11, Metabolisme) de Otto Müller, Editura Georg Thieme, Stuttgart, 1977 și 1978, 393 și 345 p., 58 și 115 fig. 40 și 78 tab., 24,8 și 24,8 DM.

Lucrarea lui O. Müller este un manual destinat studenților în biochimie precum și celor, care studiază unele discipline înrudite, cum ar fi : — în concepția autorului — microbiologia, botanica, zoologia, medicina, farmacia, chimia alimentară, chimia și fizica. Autorul o dorește în egală măsură utilă celor din industrie, gimnazii, facultăți etc. admițînd totuși că chimiștii și biologii sînt categoriile cele mai probabil interesate în lectura cărții. Scopurile ar putea să pară ambițioase dar faptele dovedesc temeinicia celor afirmate de autor. Primul capitol al lucrării se ocupă de anumite probleme mai generale privind modul în care se desfășoară viața pe pămînt. Sînt discutate problemele referitoare la fenomenele de autotrofie (fototrofie și chemolitotrofie) și heterotrofie (chemoorganotrofe), în cadrul ultimei punîndu-se și problema relației om-planetă. Diferențierea celulelor plantelor superioare și diferențierea metabolismelor, în consecință, încheie acest prim capitol. Al doilea capitol dedicat circulației materiei în biosferă prezintă circuitele biologice ale carbonului, azotului și sulfului. Această prezentare este succintă și în toate cazurile este însoțită de scheme deosebit de clare și sugestive. Fluxul energiei prin biosferă cel de al treilea capitol îl continuă în mod firesc pe cel de al doilea de care numai titlul îl separă (în fond o cerință a caracterului didactic al lucrării). Acestor trei capitole preliminare le urmează capitolele de fond. Primul de acest fel intitulat *Substanțe naturale*, tratează cele mai importante substanțe constitutive ale materiei vii, ca de exemplu : proteine, zaharurile, acizii nucleici (ARN, ADN), lipidele, lipoizii etc.

Capitolul următor *Reacții biochimice* se remarcă prin tratarea particulară a subiectului, adică reacțiile sînt prezentate în funcție de substanțele cheie, care le determină în mod critic desfășurarea. În acest fel tratarea acestor reacții se face în funcție de criterii funcționale ceea ce transferă problema în planul mult mai profund al cauzalității, obligînd la cunoașterea mecanismelor de reacție. Capitolul următor, *Enzime*, începe cu interpretarea proceselor enzimatice ca acte catalitice, fiind enumerate principalele mecanisme ale catalizei enzimatice. Capitolul cuprinde și alte aspecte ca terapia enzimatică și prelucrarea preparatelor enzimatice precum și multe altele. Volumul se încheie cu un scurt număr de selectări bibliografice. Volumul al doilea cuprinde un singur capitol, cel de-al patrulea, consacrat diferitelor tipuri de metabolisme, urmînd în general structura capitolului I din primul volum. Datorită profilului său acest volum abundă în formule chimice, scheme de reacție căi metabolice, reprezentări spațiale de compuși biologic activi și tabele comparative ale diverselor structuri. Volumul se încheie cu selecțiuni bibliografice și cu un index cumulativ de termeni.

Mihai Zamfir-Grigorescu

W. GOTTSCHALK, *Allgemeine Genetik* (Genetică generală), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1978, 141 fig., 7 tabele, 363 p. BDM 16,80

Volumul de față reprezintă o monografie de referință ce cuprinde în paginile sale atît noțiunile și conceptele clasice ale geneticii, cît și cuceririle ultimilor ani în acest domeniu, întrevăzînd totodată tendințele și direcțiile de dezvoltare viitoare.

Cartea este organizată sub forma a 13 capitole. După prezentarea cîtorva date privind organismele pro- și eukariote, autorul expune bazele citologice ale geneticii și principalele „materiale" genetice (gena, cistronul, cromozomul, genomul). Sînt relevate apoi, influențele mediului asupra acțiunii genelor și cîteva din legile geneticii clasice. O amplă dezvoltare o au pe parcursul cărții capitolele referitoare la modificările materialului genetic și principiile de bază ale evoluției. Determinarea sexului, ereditatea extracromozomială și controlul genetic al proceselor ce biosinteză sînt prezentate în paginile următoare. Ultimile capitole cuprind informații deosebit de interesante privind efectuarea sintezei proteinelor, reglării activității genelor și cercetarea bazelor moleculare ale proceselor mutaționale.

Ilustrația grafică de o remarcabilă calitate, prezentarea cu mult spirit didactic a acestui domeniu de cert interes și perspectivă, fac ca volumul de față să fie un ajutor prețios atît studenților cît și specialiștilor, medici, biologi și chimiști.

Lucia-Doina Popov

Taschenatlas der Anatomie für Studium und Praxis (Atlas de anatomie pentru studiu și practică), Vol. 1, *Bewegungsapparat* (Aparatul locomotor, de W. PLATZER ; Vol. 2, *Innere Organe* (Organele interne), de H. LEONHARDT ; Vol. 3, *Nervensystem und Sinnesorgane* (Sistemul nervos și organele de simț), de W. KAHLE, Georg Thieme Verlag, 1976, DM 19,80/volum.

Cele trei volume cuprinse în colecția de buzunar a atlasului de anatomie se caracterizează printr-o remarcabilă ținută științifică, prezentînd noțiunile de bază ale acestei discipline într-o formă didactică și deosebit de atractivă. Descrierea substratului anatomic este corelată cu funcționalitatea fiziologică și procesele biochimice care au loc la diferite nivele, evidențiind cititorului, student, medic, biolog, chimist etc. o imagine dinamică a organelor și țesuturilor prezentate.

Volumul referitor la aparatul locomotor este alcătuit din 3 părți și anume : noțiuni generale de anatomie, descrierea anatomiei aparatului locomotor și topografia capului și gîtului. În cel de-al doilea volum sînt prezentate : aparatul circulator, sîngele și sistemele limfatice organele respiratorii, glandele endocrine, aparatul digestiv, cel excretor, organele sexuale și pielea. Volumul al treilea descrie cîteva date privind sistemul nervos și histologia sa, acordînd apoi un spațiu larg prezentării măduvei spinării și nervilor acesteia. În paginile următoare sînt descrișii creierul și inervația sa, sistemul de vase, sistemul nervos vegetativ precum și unele sisteme funcționale (piramidal, extrapiramidal, placa motorie, receptorii văzului și cei musculari, căile sensibilității protoplasmatice etc.). În capitolul referitor la organele de simț sînt prezentate : ochiul, urechea și organul echilibrului.

Remarcabile sînt și ilustrațiile grafice, dintre care numeroase în culori, deosebit de intuitive pentru înțelegerea și însușirea imediată a materialului. Cititorul găsește în plus, la sfîrșitul fiecărui volum, indicații și trimiteri bibliografice corespunzătoare capitolelor descrise.

Lucia-Doina Popov

Ostwalds Klassiker der exakten Wissenschaft, Vol. 254, *Molekulargenetik, Beitrage zu ihrer Entwicklung* (Genetică moleculară, contribuții la dezvoltarea acestei științe), text ales și comentat de E. GEISSLER, Akademische Verlagsgesellschaft, Geest Portig, K. G. Leipzig, 1975, 42 fig., 19 tabele, DDRM 24

Lucrarea de față prezintă cititorului cîteva din direcțiile de dezvoltare ale geneticii moleculare în ultimii 30 de ani, de la identificarea materialului genetic pînă la realizarea sintezei „in vitro" a acesteia. Din arhivele acestei științe s-au ales ca reprezentative două articole care au contribuit — la timpul lor — la identificarea materialului genetic. Structura și replicarea acestuia este ilustrată prin celebra lucrare a lui Watson și Crick privind importanța genetică a structurii DNA, publicată în 1953 și de o altă lucrare efectuată de Goulian și col., în 1967, asupra sintezei enzimatice a DNA. În paginile următoare sînt incluse lucrări privind transportul informației genetice, natura codului genetic al proteinelor, precum și izolarea represorilor „lac". Ultima parte a cărții cuprinde studiile privind izolarea și analiza genelor individuale, cercetări efectuate în 1965 și respectiv 1970.

Cartea prezintă interes pentru privirea de ansamblu pe care o dă asupra etapelor esențiale ale dezvoltării geneticii moleculare, punctîndu-le prin prezentarea lucrărilor devenite azi clasice și care au constituit, la momentul respectiv, deschideri către aspectele nebănuite ale acestui domeniu.

Lucia-Doina Popov

H. J. ROTH, G. BLASCHKE, *Pharmazeutische Analytik* (Analiza farmaceutică), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1978, 74 fig., 25 tabele, BDM 28,80.

Volumul de față este unul din manualele utilizate de studenții facultății de farmacie pentru însușirea bazei teoretice și celor mai importante cunoștințe practice din acest domeniu.

Materialul este redactat clar și sistematic, sub forma a șapte capitole. Primul, se referă la principiile și metodele analizei calitative cuprinzînd atît determinarea elementelor minerale cît și a celor din compușii organici.

Următoarele două capitole prezintă studenților bazele teoretice și experimentale ale gravimetriei, volumetriei și electrometriei.

O atenție deosebită este acordată de autori metodelor optice și spectroscopice de analiză, incluzînd pe lîngă metodele clasice (refractometrice, polarimetrice, colorimetrie, fotometrie), date asupra spectroscopiei de absorbție în infraroșu și ultraviolet, precum și principiile spectroscopiei de rezonanță nucleară și spectrometriei de masă.

Un alt capitol se referă la tipurile principale de metode cromatografice, inclusiv cromatografia în lichide la presiune înaltă, gaz-cromatografia și cromatografia de afinitate. Ultima parte a cărții cuprinde metodele analitice curente standardizate : determinări fizice și chimice, precum și probe de identitate, impurificări, falsificări și experiențe de determinare cantitativă. În ultimile pagini cititorul poate găsi trimiteri bibliografice către tratate sau lucrări mai largi.

Caracterul didactic și accesibilitatea textului sînt subliniate și prin încadrarea definițiilor, legilor, anumitor structuri chimice sau pasaje mai importante, ușurînd astfel memorarea acestora.

Lucia-Doina Popov

Aspecte biochimice și clinice ale metabolismului corpilor cetonici (Biochemical and clinical aspects of ketone body metabolism), Editori : H. D. Söling, C. D. Seufert, Georg Thieme Publishers, Stuttgart, 1978, 120 fig., 61 tabele, 269 pag., DM 60

Volumul cuprinde lucrările prezentate și discuțiile purtate în cadrul simpozionului internațional, care a avut loc la Reinhausen. Susținute de personalități științifice de renume în domeniu, lucrările incluse în volum privesc aspectele caracteristice ale investigației corpilor cetonici.

O serie importantă de lucrări cuprind probleme legate de compartimentalizarea sintezei corpilor cetonici în ficatul de șobolan, de efectul diferiților acizi α-dimetilaril oxiacetici asupra cetogenezei „in vivo" ca și cercetări afectate reglării procesului de cetogeneză. Menționăm astfel cercetările asupra reglării cetogenezei la nivelul acetil-CoA-acetil transferazei, rolului reglator al carnitinei precum și efectele reglatorii ale Ca asupra oxidării acizilor grași și stării redox a nucleotidelor piridinice în sisteme hepatice.

Alte lucrări tratează aspectele enzimatice ale metabolismului corpilor cetonici, raportul dintre biguanide și metabolismul corpilor cetonici la animale și om, aspecte ale metabolismului acestor compuși la omul sănătos și bolnav, ca și probleme privind metabolismul corpilor cetonici în mușchi perfuzați izolați, în diferite stări metabolice.

Semnalăm de asemenea lucrările asupra utilizării corpilor cetonici în stări de înfometare, în diabet, în repaos și după exercițiu fizic și cele privind interrelațiile dintre glucoză și metabolismul corpilor cetonici cerebrali la nou născuți.

De un remarcabil interes sînt cercetările asupra alcătuirii unor sisteme model pentru studiul metabolismului acetatului activ și evidențierea ceto-leucinei (acidul α-cetoizocaproic) ca precursor al corpilor cetonici.

Alături de alte lucrări cuprinse în volum, cele două capitole afectate unor discuții generale ale specialiștilor, sînt de un deosebit interes dînd o imagine a cunoștințelor actuale în acest domeniu, atît la nivel biochimic cît și la cel al diagnosticului și patologiei clinice.

Lucia-Doina Popov

E. WIESMANN, *Medizinische Mikrobiologie* (Microbiologie medicală), Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1978, 75 fig., 27 tabele, 566 pag, 19,80 DM.

Aflat la a IV-a ediție, volumul de față este un manual sintetic și de dimensiuni restrînse care prezintă cunoștințele de bază de microbiologie medicală, necesare studenților sau celor interesați în domeniu. Utilitatea, caracterul sistematic și condiția grafică excelentă fac din acest volum o carte valoroasă. Față de edițiile anterioare, volumul este completat nu numai cu capitole noi (Bazele imunologiei, genetica bacteriilor etc.), ci și cu date și descoperiri științifice de ultimă oră.

Volumul cuprinde trei părți. Prima, *Generalități* include cunoștințe asupra relațiilor parazit-gazdă, probleme generale de epidemiologie și profilaxie, principii de efectuare a sterilizării și dezinfecției, noțiuni asupra grupelor sanguine, bazele chimioterapiei etc.

În partea de *Microbiologie specială* sînt descrise principalele clase de bacterii și de microorganisme asemănătoare bacteriilor, ciupercilor patogene umane, generalități cu privire la virusuri. Capitole aparte sînt rezervate descrierii RNA-virusurilor, a celor DNA și virusurilor neclasificate încă, precum și principalelor clase de paraziți.

Cea de-a III-a parte a cărții include aspecte de tehnică a cercetărilor microbiologice și date de diagnostic parazitologic.

Foarte utilă este și lista de tratate și monografii în domeniu inclusă în volum și necesară aprofundării problematicii. Ultimele pagini cuprind întrebări teste de un real ajutor verificării însușirii materialului expus, precum și răspunsurile la acestea. În fine, volumul cuprinde și tematica de studiu necesară studenților din primul an al cursurilor medicale.

Lucia-Doina Popov

HEME and HEMOPROTEINS, Editors: Francesco De Matteis, W. Norman Aldridge, Springer—Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1978

Volumul cuprinde 449 pagini împărțite în 11 capitole, semnate de specialiști bine informați și competenți. La acestea se adaugă un index al autorilor citați și un index pe subiecte.

Cartea trece în revistă și discută problemele fundamentale legate de structura și caracterizarea hemului și hemoproteinelor. Sînt discutate prin intermediul unei literaturi de specialitate bine adusă la zi, efectele toxice cu implicațiile lor negative asupra sintezei hemoproteinelor, produse de unele substanțe medicamentoase, metale grele sau pesticide.

Autorii acordă o atenție deosebită diferitelor varietăți biochimice și clinice ale porfirinelor. Sînt analizate de asemenea porfiriile experimentale și efectele medicamentoase asupra metabolismului bilirubinei. Un ultim capitol, consacrat intoxicațiilor cu plumb, detaliază efectele plumbului asupra sintezei hemului și globinei. În acest capitol sînt prezentate leziunile produse de plumb la nivel morfologic în diferite organe și în special în rinichi.

C. C. Prunescu

NEUROSECRETION AND NEUROENDOCRINE ACTIVITY; Evolution Structure and Function (Neurosecreția și activitatea neuroendocrină; Evoluție, structură și funcție) Ed. de W. Bargmann, A. Oksche, A. Polenov și B. Scharrer; Ed. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg New York, 1978, 441 p., 168 Fig., 49,0 $.

În august 1976 au avut loc la Leningrad, lucrările celui de-al VII-lea Simpozion Internațional asupra Neurosecreției. Această manifestare a fost condusă de prof. Andrei Polenov din Leningrad și a avut loc sub auspiciile: Consiliului Științific pentru Problemele Combinate ale Fiziologiei Umane și Animale, Institutului Sechenov pentru Fiziologie și Biochimie Evoluționistă, Institutului de Fiziologie Pavlov, Primului Institut de Medicină Pavlov din Leningrad, Universității de Stat Zhdanov din Leningrad, și Uniunii Tuturor Societăților Științifice și Anatomiștilor, Histologilor și Embriologilor. Volumul conține rezumatele tuturor comunicărilor și intervențiile aferente acestor comunicări și este dedicat memoriei lui Mathias Thomsen. El a apărut sub redacția unora dintre cei mai prestigioși participanți la simpozion: W. Bargmann (Kiel), A. Osche (Giessen), A. Polenov (Leningrad) și B. Scharrer (New York).

Lucrările sînt prezentate pe secțiuni în conformitate cu desfășurarea simpozionului, și conform acestui criteriu sînt următoarele capitole: *Aspecte evolutive ale neuroendocrinologiei, Ontogeneza sistemelor neurosecretoare, Structura și funcția sistemelor neurosecretoare în creerul vertebratelor, Sistemul neurosecretor caudal al peștilor* și *Structura și funcțiunea sistemelor neurosecretoare la nevertebrate*. Bineînțeles că acestor capitole li se adaugă unul special de concluzii în care sînt analizate tendințele și perspectivele studiilor din acest domeniu.

Primul capitol, așa cum o arată și titlul, prezintă unele aspecte privind evoluția filogenetică a sistemelor neuroendocrine, încercînd să găsească rațiunile fiziologice ale existenței lor. În acest scop se folosesc modele destinate elucidării unor aspecte mai complexe cum ar fi complexele celulare neuroendocrine din nucleii hipotalamici. Este însă greu de înțeles un fenomen atît de complicat numai prin abordarea sa la anumite nivele căci imaginea deși include mai multe secțiuni este totuși statică. Înțelegerea unor asemenea procese cere însă o imagine dinamică. Asemenea imagine accesibilă nouă, fără efortul de a suplini cu imaginația alegerile pe care viața le-a făcut în decursul evoluției, o avem prin studierea ontogeniei proceselor. Sistemele neurosecretoare beneficiază și ele de avantajul unei asemenea posibilități. Capitolul doi valorifică din plin această posibilitate, lucrările folosind un material foarte divers, om, șobolan, șoarece, găină etc. Acest fapt face posibile unele generalizări. Capitolul trei, consacrat structurii și funcției sistemelor neurosecretoare în creerul vertebratelor, este de fapt cel mai amplu (83 de lucrări) subiectul bucurîndu-se de o abordare de-a dreptul luxuriantă atît sub aspectul tehnicilor folosite și al materialului întrebuințat cît și sub aspectul structurilor cercetate.

Unele structuri de mare importanță pentru fenomenul neurosecreției deși nu foarte amplu studiate se bucură totuși de atenția specială a unui capitol. Acesta este cazul sistemului neurosecretor caudat la pești, accipenserizii fiind materialul ales cel mai frecvent.

Structura și funcțiunea sistemelor neurosecretoare la nevertebrate schițează rezolvarea la una dintre cele mai interesante întrebări ale acestui domeniu cînd, pe scara evoluției vieții, a apărut acest sistem? și ce anume a făcut necesară apariția sa? Acesta este conținutul ultimului capitol. Insectele, moluștele și crustaceii sînt punctele cele mai relevante asupra cărora cercetătorii și-au concentrat atenția. Facilitățile lor experimentale au fost pe deplin exploatate astfel încît concluziile sînt precise și abundente.

Mihai Zamfir-Grigorescu

F. E. HAHN (editor coordonator), *Progress in molecular and subcellular biology*, vol. 6 (Progrese în biologia moleculară și subcelulară), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978, 354 p., 65 figs., $ 43.

Editorul coordonator al seriei *Progress in molecular and subcellular biology* deschide volumul 6 printr-un scurt articol consemnînd una din cele mai importante descoperiri din biologia moleculară: suprapunerea parțială sau totală a două gene în cadrul aceleiași secvențe de nucleotide. Această descoperire a lui Barrel (1976), Sanger (1977), Lewin (1976) și a colaboratorilor lor deschide perspective noi în cercetarea genetică, ale căror consecințe nu pot fi încă pe deplin prevăzute.

Materialul propriu-zis al volumului este dedicat unor probleme foarte interesante, de mare actualitate, în biologia moleculară.

Una din acestea este *Clonarea DNA și analiza structurii și funcțiilor plasmidelor*. Articolul, scris de K. N. Timmis, S. N. Cohen și F. C. Cabello, face un rezumat al metodelor curente de clonare „in vitro" a fragmentelor de DNA în plasmide, și analiza ulterioară a acestora; acest rezumat nu este o trecere în revistă, ci o abordare critică, în sensul că autorii evidențiază criteriile după care una sau alta din metode asigură strategia optimă pentru o anumită problemă de clonare. În mod special autorii relevă importanța crucială a restrictazelor pentru clonare și analiza genetică, dată fiind simplitatea conceptuală și tehnică a metodelor bazate pe folosirea restrictazelor.

O altă problemă discutată în volum este *Fomarea legăturilor peptidice în sisteme non ribozomale*. Autorii H. Kleinkauf și H. Koischwitz fac un rezumat al cercetărilor recente în problema menționată. Ei se ocupă îndeosebi de etapa de elongare, avansînd ipoteza că toate enzimele care participă la reacțiile de elongare a lanțului peptidic conțin zone de recunoaștere a peptidei, controlînd în acest fel specificitatea reacțiilor. În afara acestui mecanism, autorii sugerează încă alte două mecanisme de control al elongării lanțului peptidic: (1) modificările conformaționale cu rol de control al secvenței evenimentelor și (2) aranjamentul spațial specific al aminoacizilor activați, ce se pot polimeriza doar într-o singură direcție. Articolul cuprinde

date referitoare doar la reacțiile de peptidare cu acceptori solubili (peptidoglican, glutation), fără însă a face o discuție critică a lor.

Receptori pentru opiacee și liganzii lor endogeni de A. Goldstein și B. M. Cox este un referat privind receptorii stereospecifici, cu mare afinitate, pentru opiacee, ce pot fi blocați de naloxonă precum și substanțele endogene ce pot interacționa cu acești receptori provocînd efecte tipice opiaceelor în animale intacte, ca și în preparate tisulare izolate.

Influența compușilor capabili să complexeze DNA asupra kinetoplastelor din trypanosomatide de S. L. Hajduc prezintă informația actuală privind acțiunea medicamentelor ce se pot lega de DNA asupra kinetoplastelor, baza specificității de acțiune a acestor medicamente asupra $_{k}$DNA (DNA din kinetoplaste), și mecanismele probabile prin care se formează celulele diskinetoplastice. Articolul are și o valoare practică, întrucît se știe că kinetoplastele sînt punctul de acțiune al unor medicamente folosite în tratamentul curent și preventiv al trypanozomiozelor.

Mecanisme de transformare a limfocitelor de R. L. O'Brien, J. W. Parker, J. F. P. Dixon este desigur unul din cele mai interesante referate ale volumului. Autorii rezumă și încearcă să facă o evaluare a informației actuale privind mecanismele stimulării limfocitelor și controlul proliferării acestora. Ei propun un model general de transformare, ce ține seama de cunoștințele de pînă acum privind mecanismele de stimulare și care oferă un cadru pentru orientarea cercetărilor ulterioare.

Efectele medicamentelor asupra cloroplastelor de L. Ebringer discută acțiunea antibioticelor asupra organitelor subcelulare, în special cloroplaste, din punctul de vedere al concepției după care antibioticele influențează cloroplastele în același mod în care ele influențează diferitele microorganisme. Într-adevăr, autorul arată că multe antibiotice antibacteriene, îndeosebi inhibitorii sintezei DNA și a proteinelor, afectează sistemul cloroplastic atît de grav, încît duc la apariția unor mutanți heterotrofi lipsiți de plastide. Dată fiind similitudinea efectelor antibioticelor asupra bacteriilor și cloroplastelor, *E. gracilis* poate fi folosită pentru testarea noilor derivați de sinteză a unor antibiotice, a unor noi citostatice, a mecanismelor lor de acțiune, a toxicității lor etc.

Fiecare din referate este însoțit de o bogată listă bibliografică, iar volumul se încheie cu un index de subiecte.

Interesul problemelor abordate, calitatea înaltă a referatelor fac din acest volum unul din cele mai reușite publicate pînă acum în seria *Progress in Molecular and Subcellular Biology*.

Constanța Mușolan

S. BETTINI (editor), Arthropod venoms (Veninuri din artropode), *Handbook of Experimental Pharmacology*, 48, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978, 977 p., 293 figs., $ 225.

Volumul 48 al seriei *Handbook of Experimental Pharmacology* prezintă — conform tradiției acestei serii — tot ceea ce se cunoștea pînă în 1977 în domeniul veninurilor artropodelor.

Editorul, prof. S. Bettini, a invitat în scopul alcătuirii volumului, 43 specialiști care, în cele 26 de capitole ale cărții prezintă aspectele biologice, biochimice și farmacologice ale subiectului; cu excepția introducerii, fiecare capitol este dedicat unei anumite grupe zoologice de artropode veninoase.

Deși cartea se numește *Veninuri din artropode* și nu *Artropode veninoase*, editorul a considerat necesar ca fiecare capitol să cuprindă o anumită cantitate de informație privind răspîndirea și biologia organismelor ce produc veninurile respective.

Bazîndu-se pe o anumită definiție a veninului, dată de Pawlowsky în 1927 și adoptată ulterior de majoritatea specialiștilor, editorul a inclus în cartea de față toate substanțele toxice provenind de la artropode, chiar dacă ele nu sînt produse de aparate veninoase specializate.

De asemenea, editorul a considerat oportună cuprinderea în carte și a substanțelor de apărare specifice artropodelor, care deși nu sînt toxice *sensu stricto*, induc profunde modificări în celelalte specii.

În ciuda acestei foarte largi deschideri tematice, editorul a renunțat la subiectul — mult abordat în ultimii ani — al alergiilor provocate de insecte, întrucît s-a considerat, pe de o parte, că în momentul de față există cîteva monografii foarte bune privind acest subiect, iar pe de altă parte, că el ține mai mult de imunologie decît de farmacologie.

Veninuri din artropode este încă un volum care întărește prestigiul binecunoscutei serii *Handbook of Experimental Pharmacology*.

Constanța Mușolan

J. K. KOEHLER (editor), *Advanced techniques in biological electron microscopy II* (Tehnici noi în electronomicroscopia biologică), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978, 244 p., 105 fig., $ 27.

Cu cinci ani în urmă a apărut în editura Springer cartea *Advanced techniques in biological electron microscopy*. Interesul cu care a fost primită această carte, a determinat pe editor J. K. Koehler, să publice și al doilea volum cu scopul de a oferi o imagine succintă a progreselor pe care le-a făcut microscopia electronică în răstimpul celor cinci ani. Editorul a selecționat în primul rînd acele tehnici prin care se pot obține anumite informații de natură fizico-chimică privind specimenul microscopic investigat.

Trei din articolele volumului prezintă utilizarea diferiților reactivi cu afinități specifice pentru anumite molecule de pe suprafața celulelor: lectine marcate, anticorpi marcați, alți markeri. După cum se știe, prin aceste metode s-au obținut informații deosebit de valoroase în investigarea răspunsului imun, a fuziunii celulare, a exocitozei etc.

Localizarea compușilor instabili din materialele biologice continuă să fie o problemă a microscopiei electronice. Se pare că ea ar putea fi rezolvată prin elaborarea tehnicilor de investigare la temperaturi scăzute; un articol al cărții este dedicat electronomicroscopiei „scanning" la temperaturi scăzute. O altă cale ar fi utilizarea unor specimene hidratate; această tehnică este discutată din punctul de vedere al electron microscopiei și al difracției electronice într-un articol special al cărții.

În domeniul analizei infrastructurii nucleoproteinelor, sînt prezentate două din cele mai elegante metode. Într-un articol se face o descriere detaliată a structurii ribozomilor, determinată prin studii de marcare cu anticorpi; într-un alt articol se descrie utilizarea analizei heteroduplex în cartarea genetică.

Volumul de față nu este doar o carte de referință pentru experții în electromicroscopie ci, în primul rînd, un stimul pentru biologi de a folosi tehnici noi, cu un extraordinar potențial de investigație.

Constanța Mușolan

J. D. BEWLEY, M. BLACK, *Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination; in two volumes; 1. Development, germination and growth.* (Fiziologia și biochimia semințelor în legătură cu germinația; în două volume; 1. Dezvoltarea, germinarea și creșterea), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978, 306 p., 122 fig., $ 45.

Primul volum al cărții „Fiziologia și biochimia semințelor" se ocupă de fenomenele biochimice și fiziologice ce au loc în sămînța cu capacitate germinativă și de activitățile legate strict de germinare, cum sînt mobilizarea rezervelor și dezvoltarea inițială a plantulelor. Pentru o mai bună înțelegere a acestor aspecte, autorii au considerat necesar să trateze anumite fenomene biochimice și fiziologice din semințe, de care depind evenimentele menționate mai sus.

Cartea are două capitole de interes general (structura semințelor și rezervele lor alimentare, fenomenele legate de maturizarea semințelor), după care se tratează probleme legate de germinația propriu-zisă (inhibiția, germinația, dezvoltarea plantulei; biochimia germinației și dezvoltării plantulei; mobilizarea rezervelor; procesele de control în mobilizarea rezervelor). Cartea se încheie cu un glosar de nume englezești și botanice, un index de autori și unul de subiecte.

Al doilea volum al cărții se va ocupa de controlul germinației de către factori interni și de mediu, dormanță, viabilitate, ecologia semințelor și germinației. Astfel, cele două volume vor alcătui un material cuprinzător, modern, privind germinația, util nu numai studenților, ci și cercetătorilor, dat fiind caracterul „la zi" al informației cuprinse în carte.

Constanța Mușolan

A. FIECHTER (editor coordonator), *Microbial Processes* (Procese microbiene), Advances in Biochemical Engineering, vol 9, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978, 144 p., 69 figs, 29 $.

Volumul 9 al seriei *Advances in Biochemical Engineering* cuprinde patru referate privind diverse tehnologii bazate pe procese microbiene.

Teoria și practica cultivării continue a microorganismelor în fermentațiile alcoolice industriale de V. L. Yarovenko este un referat care discută problemele ce se ridică în introducerea cultivării continue a microorganismelor în industria fermentativă a etanolului, acetonei, butanolului. Problema cea mai importantă este contaminarea cu microfloră străină ; pentru rezolvarea acestei probleme autorul consideră că este absolut necesar ca procesele de transfer din bacterii să fie bine caracterizate și să se cunoască perfect starea fiziologică a culturii continue în cadrul unor anumiți parametri.

Mecanismele de utilizare a hidrocarburilor lichide de către microorganisme și cinetica dezvoltării lor de Y. Miura abordează o problemă majoră pentru industria de prelucrare microbiană a hidrocarburilor. Referatul discută în prima parte afinitatea microorganismelor pentru hidrocarburile lichide și mecanismele prin care acestea preiau din mediu hidrocarburile. În partea a doua este descrisă cinetica dezvoltării microorganismelor cu afinitate mică, respectiv mare, pentru hidrocarburi.

Producerea microbiană a hidrogenului de J. E. Zajic, N. Kosaric, J. D. Brosseau demonstrează marea capacitate a microorganismelor de a produce hidrogen, în cele mai variate condiții. În ciuda acestui fapt, pînă în prezent acest fapt nu a fost exploatat pe scară industrială. Perspectiva obținerii H_2 industrial pe cale microbiană are, pe lîngă avantajul reducerii prețului de cost și pe cel al utilizării rezidiilor din industria morăritului, a cărnii, a uleiurilor vegetale, a lemnului și hîrtiei.

Sinteza in vitro a enzimelor. Aspecte fiziologice ale producerii microbiene a enzimelor de T. Enatsu și A. Shinmyo se ocupă de inducția sintezei de enzime, represia prin anaboliți și cataboliți. Se subliniază rolul mRNA și a ribozomilor în inițierea, elongarea și terminarea sintezei polipeptidelor ; se evidențiază unele caracteristici ale translației în sisteme acelulare.

Fiecare referat este însoțit de o listă bibliografică amănunțită, ceea ce mărește utilitatea volumului pentru toți cei interesați de domeniul ingineriei biochimice.

Constanța Mușolan

A. J. BERTINCHAMPS (editor coordonator), *Effects of ionizing radiation on DNA* (Efectele radiațiilor ionizante asupra DNA), Molecular biology, biochemistry and biophysics, vol. 27, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978, 383 p., 74 figs., 43 $.

Volumul de față este prima carte în care efectele radiațiilor ionizante asupra DNA sînt prezentate sub toate cele trei aspecte : fizic, chimic, biologic.

Cartea este, de fapt, rezultatul cooperării unui grup european de studiu asupra *Efectelor primare ale radiațiilor asupra acizilor nucleici* organizat de Comisia comunităților europene, și cuprinde contribuția a 23 de specialiști.

Materialul cărții este organizat după principiul succesiunii evenimentelor în iradierea cu radiații ionizante a DNA : *1)* absorbția energiei și formarea radicalilor liberi, *2)* transformarea chimică a acestor radicali în produși de reacție stabili, *3)* efectele provocate de încorporarea acestor produși anormali în sistemele biologic active.

În secțiunea întîia sînt prezentate aspectele fizice : structura și proprietățile electronice ale DNA ; interacțiunea radiațiilor ionizante cu materia ; structura radicalilor componentelor acizilor nucleici ; structura radicalilor acizilor nucleici ; randamentul producerii radicalilor ; producerea radiomimetică a radicalilor ; fenomene de transfer.

În secțiunea a doua se discută aspectele chimice : evenimentele primare în radioliza acizilor nucleici ; degradarea bazelor din DNA prin iradiere ; degradarea carbohidratului din molecula DNA ; modificări al structurilor secundare și terțiare ale DNA după iradiere.

În secțiunea a treia sînt cuprinse aspecte biologice : efectele radiațiilor asupra funcțiilor biologice ale DNA ; modificările leziunilor induse prin iradiere ; procese de reparare a DNA iradiat ; aspecte moleculare ale mutagenezei induse de radiațiile ionizante ; concluzii și perspective.

Fiecare din cele trei secțiuni are o listă bibliografică, iar volumul are un apendix cu noțiuni de radiobiologie, precum și un indice de subiecte.

Actualitatea subiectului și calitatea științifică a materialului fac din acest volum o carte de referință în radiobiologie.

Constanța Mușolan

GERMAN WEISS, *Laboruntersuchungen nach Symptomen und Krankheiten. Mit differential-diagnostischen Tabellen* (Teste de laborator în funcție de simptome și boli. Cuprinde tabele de diagnostic diferențial), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978, 906 p., 34 $.

Această carte este un ajutor prețios în rezolvarea problemelor de diagnostic diferențial ce apar în practica medicală de fiecare zi.

Bolile sînt ordonate alfabetic. În cazul fiecărei boli se descrie în primul rînd simptomul specific, precum și testele de laborator cele mai elocvente pentru diagnosticarea bolii respective. Testele recomandate, nivelul parametrilor dozați sînt exprimate în simboluri ușor inteligibile, care fac materialul cărții mult mai concis, simplu de utilizat de medici în practica curentă. Numeroasele tabele de diagnostic diferențial sînt încă un argument pentru marea utilitate a acestui volum.

Pe lîngă secțiunea de catalogare alfabetică a bolilor, cartea are un apendice de unități de măsură și valori normale în unități SI, precum și factorii de transformare a unităților vechi în cele noi, pentru teste în sînge, plasmă, urină.

De asemenea este dat un catalog de teste, reactivi și aparatură furnizate de diferite firme.

Orice medic practician va găsi în această carte un ajutor prețios pentru activitatea sa curentă.

Constanța Mușolan

Anesthesiology and intensive care medicine, 109, 20 JAHRE FLUOUTHANE (Fluothanul în al 20-lea an), editat de E. Kirchner, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978, 343 p., 151 figs., 29 $ U.S.A.

Volumul cuprinde lucrările simpozionului *Fluothanul în al 20-lea an*, organizat cu ocazia aniversării a 10 ani de la înființarea Institutului de Anesteziologie din Hanovra.

Fluothanul, cunoscut mai ales sub numele de Halothan, a fost utilizat pentru prima dată în anesteziologia umană în 1956, deschizînd o nouă eră în practica narcozei prin inhalație.

Simpozionul a reunit o serie de lucrări care studiază efectele fluothanului, ca și a altor narcotice de inhalație, din diverse puncte de vedere. S-au prezentat date biochimice, farmacologice și clinice privind acțiunea halotanului asupra circulației, respirației, ficatului și rinichiului, precum și narcoza de inhalație în sisteme închise.

Cercetările privind determinarea gazelor și vaporilor narcotici și eliminarea lor prin aerisire sau filtrare au o valoare practică deosebită pentru toți cei ce lucrează în domeniul anesteziei.

Constanța Mușolan

ATHEROSCLEROSIS — IS IT REVERSIBLE? (Ateroscleroza — este reversibilă?), editori G. Schettler, E. Stange, R. W. Wissler; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978, 104 p., 43 figs., 17 tabele, $ 14.

Această monografie prezintă experiențe în care s-a reușit o regresie apreciabilă a aterosclerozei la animale și oameni. Se aduc dovezi că un control riguros și de lungă durată a hiperlipidemiilor duce final la regresia aterosclerozei.

Monografia este împărțită în două părți. Prima parte tratează problema aterogenezei: mecanismele de depunere a lipidelor în peretele arterial, dovezi privind originea monoclonală a plăcilor de ateroscleroză la oameni, factori care stimulează proliferarea musculaturii netede, modele animale de aterogeneză. Această parte se încheie cu o discuție privind factorii de dietă, în afara lipidelor, în aterogeneză.

Partea a doua a cărții, cea mai importantă, tratează procesul regresiei: componentele leziunii și regresia în animalelele de experiență; regresia la primate, îndepărtarea colesterolului din celulele intacte și a lipidelor din explantele aorice aterosclerotice, și — în sfîrșit — factorii de risc și regresie.

Această carte este o foarte bună sursă de informații privind spectaculoasele progrese ce s-au făcut în terapia aterosclerozei provocate la animale de experiență. Din păcate, situația este mai complicată în cazul oamenilor, la care procesul de instalare a aterosclerozei este mult mai lent, la care și regresia — chiar dacă are loc — este mult mai lentă. Totuși, și în terapia atero-

sclerozei la oameni, există rezultate încurajatoare, după cum arată angiografiile și măsurătorile de circulație periferică la pacienți cu hiperlipoproteinemie, la care hiperlipidemiile au fost riguros controlate o anumită perioadă.

Constanța Mușolan

Heidelberger Taschenbücher, vol. 192 ; A. Grafe ; VIREN— PARASITEN UNSERES LEBENSRAUMES (Virușii — paraziți ai mediului nostru de viață), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977, 179 p., US $ 9. 20.

Cel de-al 192-lea volum al seriei „cărților de buzunar" continuă tradiția, în sensul prezentării unui subiect cu mare audiență — virușii — într-o manieră lejeră, ușor accesibilă, fără rabat la fundamentarea științifică.

De la bun început trebuie apreciată capacitatea de conciziune a autorului. care în mai puțin de 200 pagini tratează un subiect despre care s-au scris peste douăzeci de volume, cuprinzînd mai mult de 6000 pagini.

Această carte răspunde unor întrebări cheie privitoare la virusi, și anume ce sînt aceștia și în ce relație ne aflăm noi, oamenii, cu virușii. Autorul aduce dovezi în sprijinul definirii virușilor drept nucleoproteide simple, clasificabile și reproductibile, existente ca paraziți oriunde se află vreo formă de viață. În special se discută rolul virușilor ca agent patogen pentru oameni, animale, plante, ca agent mutagen, teratogen și oncogen. În legătură cu cele de mai sus, se evidențiază căile de îndepărtare sau atenuare a efectelor patogene ale virușilor, prin teste de diagnoză, și măsuri de dezinfecție, de terapie și profilaxie.

Bogat ilustrată, scrisă într-un stil clar și atrăgător, cartea oferă o foarte instructivă lectură.

Constanța Mușolan

Topics in current chemistry, vol. 69, INORGANIC BIOCHEMISTRY (Biochimie anorganică), vol. II, editor F. L. Boschke, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977. 204 p., US $ 37.

Seria *Topics in current chemistry* publică — după cum constatam cu prilejul recenzării unor volume anterioare — referate generale privind tendințele actuale și de perspectivă în cercetarea chimică modernă. Acest al doilea volum de Biochimie anorganică se încadrează profilului seriei. El cuprinde trei referate generale, privind interacția dintre ionii metalici și organismele ce trăiesc în mări, schimbul metabolic de gaze în biochimie și — în sfîrșit — formarea de complexi între cationii monovalenți și liganzi biofuncționali.

Primul referat prezintă progresele înregistrate în înțelegerea impactului ionilor de metale grele, (V, Cr, Fe, Cu, Pb, Hg), deversate de om în apele mării, cu organismele marine. Aceste elemente sînt fie esențiale pentru nutriția umană sau animală (V, Cr, Fe, Cu), fie neesențiale, acumulîndu-se în organismele marine și provocînd — în limite ce depind de organism — efecte toxice (Pb, Hg). Efectele acumulării ionilor în apele marine sînt studiate mai ales la nivelul fitoplancronului, dar și al unor moluște.

Al doilea referat tratează un subiect foarte interesant și anume schimbul metabolic de gaze în organismele vii. Subiectul este astfel tratat, încît se evidențiază soluțiile deosebit de ingenioase pe care le-a „găsit" natura, prin încercări și greșeli, pentru a rezolva problemele schimbului metabolic de gaze. Astfel, referatul nu se limitează doar la descrierea unor ansamble de reacții biochimice sau a unor principii biologice, ci încearcă să trezească interesul pentru extraordinara elaborare și întrepătrundere a unor complexe secvențe de reacții, ce duc la starea de quasiechilibru dinamic, caracteristic viului. Autorul nu cuprinde în acest referat toate procesele metabolice ce implică schimbul gazos ; cea mai mare parte a articolului este dedicată fotosintezei. pe lîngă care mai sînt discutate fixarea azotului și unele procese în organismele heterotrofe.

Ultimul referat al volumului, cel mai amplu (cca 100 p.), tratează o problemă de interes îndeosebi pentru neurobiologie, ca și pentru biochimia transportului in general. Ipoteza „purtătorului", propusă de fiziologi pentru a explica selectivitatea transportului prin membrane a cationilor monovalenți, a fost reactualizată odată cu constatarea că multe antibiotice sau alți compuși sintetici facilitează transportul ionilor alcalini prin membranele naturale și artificiale. Acești „purtători" se caracterizează printr-o anumită arhitectură structurală ce interacționează

specific cu un ion de o anumită dimensiune. Referatul de față prezintă aspectele fizico-chimice ale acestui fenomen specific biologic, îndeosebi stabilitatea complexilor și rata substituției ligazilor. Caracteristicile moleculare unice ale ligazilor au dus la o serie de aplicații practice, prezentate în încheierea referatului : utilizarea polieterilor ca lipofilizanți, folosirea ligazilor ca electrozi ion-selectivi, aplicații biomedicale ale valinomicinei și ale altor antibiotice liganzi, folosirea litiului ca agent psihoactiv.

Aria largă de investigații cuprinsă în cele trei referate, este o garanție a interesului pe care îl prezintă acest al doilea volum de biochimie anorganică.

Constanța Mușolan

CHEMORECEPTION IN THE CAROTID BODY (Chemorecepția în corpul carotid) ; editori H. Acker, S. Fidone, D. Pallot, C. Eyzaguirre, D. W. Lübbers, R. W. Torrance ; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977, 293 p. 101 figs., 21 tabele, US $ 24,90.

Volumul cuprinde lucrările unui meeting ținut la Institutul Max Plank pentru fiziologia sistemelor, Dortmund, sub egida Societății Max Plank pentru dezvoltarea științelor și a Asociației germane pentru cercetare.

Problema corpului carotid a constituit obiectul a o serie de manifestări științifice, organizate de-a lungul anilor la Oxford (1966), Bristol (1973), Kashmir (1974), Dortmund (1977).

Lucrările prezentate la Dortmund demonstrează că actuala direcție de cercetare este axată pe mecanismele celulare ale chemorecepției ; cele mai multe comunicări s-au ocupat de diferitele tipuri de celule din corpul carotid și mediul lor înconjurător, și anume pO_2 și fluxul local. Acestea au constatat în analize microscopice și electronomicroscopice ale caracteristicilor morfometrice și histochimice ale diferitelor tipuri de celule, determinări microelectrochimice ale țesutului glomoid, cu scopul lămuririi conversiei stimulării chimice în activitate nervoasă, cercetări biochimice și fiziologice ale dependenței proceselor chemoreceptive de consumul de O_2 și turnoverul catecholaminelor.

Concluziile finale ale acestui meeting demonstrează progresul cunoașterii în domeniul corpului carotid, unele elemente putînd fi extinse la domeniul mai larg al chemorecepției în general.

Constanța Mușolan

Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics, 26, ARTHUR S. BRILL, *TRANSITION METALS IN BIOCHEMISTRY* (Metale de tranziție în Biochimie), Ed. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977, 186 pag., U.S. $ 22.

Lucrarea lui Arthur S. Brill este o monografie referitoare la rolul metalelor de tranziție în biochimie, cartea reunind în mod programatic cunoștințe dobîndite prin diverse tehnici și metode de fizică și de chimie. Rolul metalelor de tranziție în sisteme vii precum și în sisteme de biomolecule, de polimeri este important sub diverse aspecte pentru biologie, biochimie, chimie, biofizică, medicină, farmacologie. Studiul acestor probleme reprezintă un domeniu de lucru comun pentru oameni de știință de formații diferite, ce utilizează metodologii diferite.

Cartea reprezintă o trecere în revistă a cunoștințelor din domeniu, ocupîndu-se atît de problemele teoretice cît și de principalele tehnici experimentale cu care s-a obținut informație relevantă asupra problemei. Autorul prezintă în general rezultatele obținute prin cîte o tehnică particulară fără să prezinte fundamentele tehnicii în sine ; pentru cunoașterea acestora (spectroscopie și difracție de raze X, rezonanță electronică de spin, rezonanță magnetică nucleară, spectroscopie Raman, spectroscopie Mossbauer și altele) se recomandă o bibliografie de bază. Întrucît cea mai multă informație s-a obținut din interacție cu cîmpul magnetic (RES, RMN, EMDOR) respectiv cu lumina (absorbția, dicroism) aceste aspecte sînt tratate mai amănunțit în fiecare caz particular discutat.

Dintre aspectele teoretice sînt prezentate cele nemijlocit necesare în cuantificarea și interpretarea rezultatelor experimentale cu suficiente exemple, scheme, formule de calcul pentru ca cititorul să poată parcurge literatura de specialitate respectiv să poată efectua calculele în urma experimentelor proprii. Toate acestea sînt însă dificil de abordat fără cunoștințe de chimie cuantică.

Spațiul cel mai larg este acordat discutării ionilor cuprului, fierului (hemic și monohemic), molibdenului, cunoștințele referitoare la acestea fiind de fapt și cele mai consolidate.

Cartea este însoțită de o bogată listă bibliografică referitoare inclusiv la aspectele mai puțin discutate în carte, eventual controversate, referitoare la speculații și interpretări ce nu sînt general acceptate. Lista de literatură include și lucrări fundamentale de chimie, de fizică referitoare laaspecte teoretice sau experimentale implicate de domeniu.

Gabriela Anghel

Atherosclerosis IV, Proceedings of the fourth International Symposium (Ateroscleroza, lucrările celui de al IV-lea Simpozion Internațional), Editori: G. Schettler, Y. Goto, Y. Hata, G. Klose, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 308 fig, 185 tabele, 797 pag., 1977, $ 49,70.

Factorii de risc ai societății moderne (fumatul, hiperlipoproteinemia, obezitatea, lipsa exercițiului fizic, hipertensiunea, diabetul, stress-ul etc) au accentuat în mod dramatic ritmul de apariție al aterosclerozei în ultimii ani. Paralel cu aceasta, tot mai numeroase cercetări caută să găsească modalitățile practice pentru oprirea sau încetinirea ritmului de apariție ale acestei boli cu consecințele sale infarctul de miocard, hemoragii cerebrale, blocarea arterelor renale etc. consecințe care se manifestă cu precădere la oameni în vîrstă, deși sînt semnalate și la copii sau tineri.

Volumul de față cuprinde o imagine de ansamblu a cercetărilor efectuate în acest domeniu pe baza lucrărilor prezentate la simpozionul ce a avut loc la Tokyo în 1976. Volumul este organizat în 6 părți.

În prima parte sînt expuse lucrări privind relația dintre peretele arterial și factorii de risc ai bolilor coronariene, insistînd asupra rolului componenților lipidici (lipoproteine, lipide, trigliceride). Un capitol aparte este rezervat epidemiologiei aterosclerozei și existenței unor diferențe de ordin geografic în ce privește natura factorilor de risc. Se acordă de asemenea o deosebită atenție rolului țesutului conectiv și mecanismelor imunologice în apariția acestei maladii.

Partea a doua a cărții cuprinde referate generale și articole originale asupra lipoproteinelor serice și plasmatice, asupra metabolismului colesterolului, a corelației dintre hormoni, lipoprotein-lipază și ateroscleroză. Semnalez aci interesul alcătuirii de modele — pe animale — de instalare și încetinire a ritmului aterosclerozei și lucrările afectate metabolismului țesutului conjunctiv în acest proces.

În stadiul actual al cercetărilor prezintă interes și lucrările cuprinse în partea a III-a a cărții, privind încetinirea ritmului apariției acestei boli și corelația dintre factorii nutriționali și aterosclerozã.

Partea a IV-a a cărții însumează cercetările epidemiologice asupra bolilor aterosclerotice, iar partea a V-a se ocupă de apariția acestei maladii la copii, acordînd un spațiu larg factorilor specifici de risc ai vîrstei tinere.

Ultima parte a cărții se referă la tratamentul aterosclerozei umane. Sînt incluse aci lucrările secțiunilor privind hiperlipoproteinemiile, tromboza și ateroscleroza, culturile de celule, apariția acestei boli în condițiile lipsei principalilor factori de risc, precum și testele de intervenție. Ultimele pagini ale volumului cuprind: rezumatele generale ale lucrărilor prezentate, rezumatele a patru filme științifice și 68 pagini de bibliografie la zi, incluzînd titlul articolelor.

Pe lîngă condiția grafică excelentă, se remarcă cu prisosință valoarea științifică a acestei cărți ce prezintă cititorului un bogat material teoretic și experimental asupra aterosclerozei, subliniind totodată direcțiile de perspectivă ale cercetărilor actuale care au drept scop încetinirea ritmului de apariție al acestei maladii.

Lucia-Doina Popov

Monographien aus dem Gesamtgebiete der Psychiatrie (Monografii asupra întregii psihiatrii), Psychiatry series (Serii de Psihiatrie) vol. 18 „TRANSMETHYLATIONS AND THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM" (Transmetilări și sistemul nervos central) Editat de V. M. Andreoli și C. Fazio; Ed. Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg, New York, 1978, 185 p., 45 fig.

Metilarea diverșilor compuși de interes biologic este o reacție de mult cunoscută și mecanismul ei este în majoritatea cazurilor complet elucidat astfel încît, în general, importanța acestei reacții ar părea să fie și ea suficient de înțeleasă.

Totuși numai de curînd a fost posibilă înțelegerea rolului ei hotărîtor pentru funcționarea sistemului nervos central ai căror mediatori chimici, aminele biogene, își leagă structurile și efectele fiziologice de acest proces. În acest fel procesul metilării devine fundamental atît pentru înțelegerea proceselor psihologice normale cît și a celor patologice, fie acestea din urmă permanente ca în cazul unor boli ereditare, fie tranzitorii, ca în cazul administrării unor substanțe halucinogene.

Comportarea și psihologia omului ne apar în acest fel drept consecințele apariției în corpul său a unor mediatori chimici metilați.

Cît de mare este importanța acestui punct de vedere, ne putem da seama numai dacă ținem seama de faptul că unele boli deosebit de grave, cum ar fi schizofrenia, par a fi rezultatul acumulării excesive a unor produși metilați cu marcate efecte halucinogene. De altfel mulți mediatori chimici care s-au dovedit punctele de plecare ale unor tipuri extreme de comportare sînt de fapt compuși metilați în cantități mari, rezultînd fie dintr-o activitate de metilare excesiv de ridicată fie din reținerea anormal de puternică a lor în țesuturile sistemului central nervos. Prezentarea acestor probleme constituie de fapt conținutul acestei lucrări. Înțelegerea acestor chestiuni necesită cunoașterea legăturilor biochimiei sistemului nervos central cu comportarea și de aceea primul capitol se ocupă cu această problemă.

Sînt prezentate în continuare elementele dinamice ale acestor procese enzimale transmetilante. În strînsă legătură cu acestea este discutat un intermediar deosebit de activ al transmetilărilor : S-adenozil-L-metionina (ca folosire a testelor biologice care o implică, ca partener de metilare a aminelor biogene, ca legătură cu histamina, ca legătură cu metabolismul cerebral al acidului gama amino butiric etc.).

Mai este prezentat de asemenea efectul hiperamonemiei acute asupra metabolismului cerebral și a stării energetice a creerului. Dată fiind importanța S-adenozil-L-metioninei majoritatea capitolelor i se adresează. Astfel se prezintă distribuția ei (ca produs radioactiv) în animalele de experiență, iar un capitol demonstrează concentrarea sa de predilecție în sistemul nervos central după injectarea intramusculară.

Capitolul următor detaliază problema prezentînd distribuția ei subcelulară iar următorul se ocupă de posibilitățile reducerii concentrației sale și de urmările acestor posibilități. Comportarea șoarecilor la administrare de S-adenozil-L-metionină este un alt capitol care prezintă o problemă de fiziologie normală.

Sînt de asemenea prezentate aspecte privind fiziologia și patologia umană. Astfel, se prezintă cinetica S-adenozil-L-metioninei în sîngele uman și nivelele sale sanguine la schizofrenici și deprimați.

În fine, se fac aprecieri asupra posibilității folosirii S-adenozil metioninei în clinica psihiatrică.

Lucrarea este succintă, fluentă și limpede prezentată ceea ce o face deosebit de accesibilă, deși trebuie subliniat că în afară de aceste calități cumulează una hotărîtoare pentru o lucrare științifică — exactitatea.

Mihai Zamfir-Grigorescu

REVIEWS OF PHYSIOLOGY, BIOCHEMISTRY AND PHARMACOLOGY (Referate de fiziologie, biochimie și farmacologie), Vol. 84, de H. P. Godfrey ; P. G. H. Gell ; E. Wintersberger ; H. Z. Movat, Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg. New York, 1978, 240 p., 23 fig., 39,00 $.

Acest volum cuprinde trei părți referitoare la trei domenii : imunologie, genetică și hematologie. De fapt este vorba de lucrări de sinteză de mare valoare și întindere. Prima lucrare intitulată *Evenimentele celulare și moleculare în hipersensibilitatea întîrziată incipientă* se ocupă de procesul hipersensibilității întîrziate din punct de vedere al fiziologiei celulare la nivel molecular. În acest scop autorii au separat diferitele aspecte ale problemei în cadrul a șapte capitole. Primul capitol constituie de fapt introducerea și prezintă succint fenomenul, ca istoric, conținut și mobil al lucrării. Capitolul secund conține clasificarea după Coombs și Gell a hipersensibilităților împreună cu comentariile autorilor care insistă în mod deosebit asupra celui de al patrulea tip în care ei încadrează procesul descris. Mergînd pe această linie capitolul trei prezintă hipersensibilitatea anticorp-dependentă asociată bazofilelor. Capitolele patru și cinci sînt de fapt capitolele de fond, ele prezentînd fenomenul ca atare și în paralel cu altele similare, exploatîndu-se ca experiment și teorie, toate analogiile utile. Cele două capitole constituie de fapt o unitate tematică, fapt care și explică plasarea la sfîrșitul ultimului capitol a unui comen-

tariu care se referă la ambele. Capitolul șase tratează chestiunea factorului de transfer constituind o firească finalitate a acestei cercetări (în afara definirii și caracterizării și bineînțeles a comentariului capitolul conține numai aplicațiile terapeutice ale acestui factor). Capitolul șapte și ultimul cuprinde concluziile și un foarte condensat rezumat. Abreviațiile și bibliografia selecționată sînt numai două dintre cele mai evidente dovezi ale seriozității lucrării.

Cea de-a doua lucrare *Replicarea ADN-ului la eucariote*, este o lucrare tipică de genetică dar de pe pozițiile biologiei celulare și de aceea uzează din abundență de noțiuni de citologie, citofiziologie și enzimologie. Prezentarea chestiunii se face în decursul a zece capitole, unele dintre ele fiind impresionante prin marea lor concentrare. După o scurtă introducere se trece la descrierea structurii cromatinei, respectiv a constituenților ei și a nucleosomilor, prezentîndu-se apoi replicarea cromatinei (factorii generali ai replicării cromozomilor la eucariote, și intermediarii replicării ADN-ului). Enzimologia replicării ADN-ului constituie conținutul capitolului IV și prezintă polimerazele ADN-ului precum și alte enzime implicate în polimerizarea ADN-ului. Capitolul cinci, referitor la reglarea replicării ADN-ului se ocupă în mod deosebit de faza S, din punctul de vedere al inițierii și al evoluției sale în timp. Următoarele trei capitole sînt în ordine : *Sinteza proteinelor cromozomale, Fidelitatea replicării ADN-ului* și *Mecanismul amplificării genelor*. Ele au un caracter monolit nefiind fragmentate în subcapitole. *Replicarea ADN-ului mitocondrial*, penultimul capitol pune o problemă de un mare interes biologic și se bucură de aceea de o tratare mai deosebită. Lucrarea se încheie cu un capitol de concluzii și chestiuni de perspectivă, urmînd evident o abundentă bibliografie selectată. Cea de-a treia lucrare *Sistemul Kininei : legăturile sale cu coagularea sîngelui, fibrinoliza și elementele figurate ale sîngelui*, deși în domeniul hematologiei conține foarte numeroase elemente de biochimie. Principalele probleme prezentate sînt : factorul XII, prekalikreina și kalikreina kininogenii, sistemul fibrinolitic, formarea kininei de către proteazele leucocitelor neutrofile, inhibitorii plasmatici ai proteazelor, și bradikinina și kininele înrudite. Lucrarea are o ținută deosebită și este un model de ordine și conciziune.

Mihai Zamfir-Grigorescu

NATRIURETIC HORMONE (Hormonul natriuretic) Edit. de H. J. Kramer și F. Krück, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1978, 149 p., 6 fig., 19 tab., 16,00 $.

Existența hormonului natriuretic a fost nu numai preconizată dar, de asemenea și dovedită prin anumite experiențe cum ar fi cele de circulație încrucișată, care au impus definitv ideea existenței controlului hormonal asupra eliminării urinare a sodiului. În acest fel s-a deschis un domeniu și odată cu el și-au croit drum și numeroase întrebări, cum ar fi care este rațiunea fiziologică a unei asemenea activități umorale natriuretice ; ce fenomene în condiții fiziologice, dar mai ales patologice, pot fi explicate numai prin existența unui asemenea hormon ; care este compoziția chimică a acestui hormon (este vorba de o substanță sau de efecte ale altora, deja cunoscute, și atribuite eronat unui hormon natriuretic inexistent) ; care este substanța produsă și eliberată și care sînt condițiile eliberării ei ; care este situsul său exact de acțiune ; care este mecanismul său de acțiune ; și multe altele de acest fel.

Tuturor acestor întrebări au căutat să le răspundă savanți din S.U.A., Anglia, Belgia, Elveția, Germania, Israel și U.R.S.S. în cadrul simpozionului asupra *Hormonului natriuretic*, ce a avut loc la Bonn pe 16—17 iulie 1976.

Lucrările susținute și discuțiile aferente acestora sînt înmănunchiate în volumul de față și prezentate într-o formă cît mai apropiată de însăși desfășurarea simpozionului. În acest sens ni se pare potrivit să amintim că lucrarea prezintă comunicările și discuțiile pe cele trei secțiuni pe care și-a desfășurat lucrările simpozionul. Acestea au fost conduse de F. Krück, A. Nizet și K. Thurau. Lucrările primei sesiuni privesc unele aspecte ale mecanismelor hormonale ale natriurezei și ale reglării acesteia (ca volum de fluid extracelular) cu participarea receptorilor centrali de volum. De asemenea mai sînt prezentate probleme ale activităților antinatriferice precum și anumite observații privind substanțele natriuretice care apar în urina subiecților umani normali. Lucrările sesiunii a II-a examinează natriureza prin prisma unor boli (hepatice. cardiace) și a controlului său hormonal evaluînd rolul posibil al prostaglandinelor și calicreinei. De asemenea se consideră problema originei renale a materialului natriuretic împreună cu cîteva proprietăți chimice ale acestuia. Sesiunea a III-a prezintă lucrări menite să elucideze rolul materialului natriuretic asupra Na-K-ATP-azei renale și probează efectul inhibitiv al acestuia. Totodată se prezintă factorul natriuretic în uremia cronică și cromatografie pe coloană de Sephadex, a activității plasmatice antinatriferice.

Mihai Zamfir-Grigorescu

CURRENT TOPICS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY (Probleme curente în microbiologie și imunologie) vol. 81, de F. Melchers, M. Potter, L. N. Warner, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1978, 248 p., 64 tabele, 85 fig.

Acest volum are ca subtitlu : *Linii hibride limfocitare* și reunește de fapt lucrările celui de-al doilea seminar despre *Proprietățile funcționale ale tumorilor limfocitelor T* și *B* organizat de Institutul Național de Cancer în 3—5 aprilie 1978, la Bethesda, Maryland, U.S.A.

Înainte de prezentarea comunicărilor se face un scurt istoric asupra stadiului actual al cunoștințelor și a realizărilor obținute în acest domeniu. Astfel se arată că pînă de curînd, o problemă de mare dificultate, dar și de mare interes a constituit-o creșterea de celule mielomatoase umane in vitro. Succesele din ultima vreme obținute cu culturile de limfocite, au deschis drumul pentru producerea de linii hibride (hibridoame) limfocitare umane care produc anticorpi monoclonali umani și se iau deja în considerație posibilitățile de aplicare în clinică. Se prevede de asemenea că folosirea acestei tehnici ar putea duce la înlocuirea animalelor de experiență în laboratoarele de cercetare. În continuare este dată o listă exhaustivă cu numele participanților la seminar, care au obținut linii hibride specifice. Au fost expuse un număr de 39 comunicări, ilustrate cu figuri și tabele și cu un bogat material bibliografic. Baza simpozionului a constituit-o lucrarea *Fuzionarea celulelor mielomatoase de șoarece cu celule splenice*. Realizarea acestui deziderat prin obținerea de linii celulare continui care produc anticorpi omogeni, a provocat o adevărată revoluție în serologie. Lucrările care au fost prezentate în cadrul seminarului pot fi împărțite în două mari grupe. Citām cîteva aspecte din grupa care se ocupă și expune rezultatele referitoare la prepararea de anticorpi monoclonali față de celulele de pe suprafețe : producerea de anticorpi monoclonali față de antigenele limfocitare umane de membrană și față de celulele leucemice în vederea folosirii lor ca probe martor ; creșterea sub formă de tumori la șoarece a liniilor celulare hibride care eliberează în mod continuu anticorpi de specificitate dată ca mijloc de analizare a unei mari cantități de anticorpi monoclonali față de antigenele de pe suprafața limfocitelor ; identificarea și studierea celulelor de pe suprafața moleculelor, care au funcții imune specifice și sînt markeri ai subpopulațiilor diferențiate de globule roșii, de un mare interes imunologic ca și procedeele folosite pentru decelarea antigenelor prezente într-un procentaj mai mic de 5% din celulele imunizante. Deoarece era de așteptat că se va constitui o metodologie preferențială pentru obținerea de reactivi serologici stabili și cu o înaltă specificitate, o altă grupă de lucrări expune aceste metodologii : tehnici de obținere a hibrizilor între celulele mielomatoase de șoarece și limfocitele umane dintre care unii produc fie IgG fie IgM uman ; inducerea formării de IgM prin fuzionarea de celule limfomatoase B murinice cu celule mielomatoase ; modificarea procedeului fuzionării celulare pentru recuperarea liniilor de celule hibride care produc anticorpi IgG față de anumite aloantigene și imunoglobuline alotipice de șoarece ; sînt descrise metodologii specifice pentru a obține randamente ridicate de hibrizi care produc imunoglobuline și a simplifica și grăbi selectarea de hibrizi producători de anticorpi cu specificitate dată. Obținerea unui număr suficient de hibrizi pentru studiu, devine astfel un scop practic, chiar cînd frecvența unor astfel de hibrizi este scăzută. În alte lucrări se arată posibilitățile de exploatare a unor avantaje și de înlăturare a unor impedimente care apar în cursul procesului de fuzionare și se dau indicații de folosire a tehnologiei hibridării celulare pentru cercetarea biologiei sistemului imun. Printre acestea menționăm : folosirea acestor reactivi monospecifici ca probe martor serologice și ca probe martor moleculare, cu care se pot obține informații noi asupra reacției antigen-anticorp ; posibilitatea de a analiza imunoglobulinele componente ale unui individ imunizat și de a studia efectele biologice ale acestor linii hibride de anticorpi ; obținerea de hibrizi om-șoarece avînd ca rezultat conversia celulelor B umane neformatoare de anticorpi de celule anticorpoformatoare de IgG umană prin hibridări repetate între celulele leucemice B umane care nu eliberează imunoglobuline și celulele mielomatoase de șoarece ; hibridarea celulară a populațiilor de limfocite T selectate cu celule tumorale T, ca metodă utilă pentru stabilirea de linii permanente de culturi de țesuturi cu caracteristicile limfocitelor T.

Lucrările acestui seminar au lăsat să se întrevadă că multe laboratoare de cercetare ar putea aborda tehnologia culturilor de țesuturi ca și domeniul imunologiei. Rezultatele prezentate vor putea stimula aplicarea liniilor hibride limfocitare în multe probleme de cercetare biologică și biomedicală și vor putea astfel mări numărul celor care vor obține linii hibride limfocitare specifice.

Corina Mihail

M. FUKUDA, N. BÖHM, S. FUJITA, *Cytophotometry and its biological application* (Citofotometria și aplicațiile sale în biologie), Progr. Histochem. Cytochem. vol. II, Nr. 1, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York, 62 fig, 4 tabele, 119 pag. D. M. 62.

Este bine cunoscută astăzi valoarea citofotometriei de absorbție și a celei de fluorescență pentru histochimia și citochimia cantitativă, permițînd estimări reproductibile ale unor constituenți celulari sau a unor produși metabolici intracelulari. Volumul de față cuprinde o trecere în revistă a principalelor metode de citofotometrie de absorbție și de fluorescență, insistînd asupra surselor de erori ale acestor determinări.

Studiile efectuate în perioada 1971—1972 de un grup de cercetători japonezi au dus la concretizarea unei noi metode de măsurare în citofotometria de absorbție, înlocuind erorile datorate pierderilor nespecifice de lumină în cursul împrăștierii acesteia.

În ce privește citofotometria de fluorescență s-a constatat că iradierea probei de măsurat înainte (pre-iradiere) sau după colorarea acesteia (post-iradiere), duce la înlăturarea fenomenelor de fluorescență primară. Astfel, deviația standard în fotometria DNA în celulele colorate cu reactiv pararosanilină-Feulgen, poate atinge valori sub 5% (adesea sub 2%) din valoarea medie. Determinările intensității fluorescenței sînt reproductibile indiferent de prelucrarea plăcilor sau de persoana care le efectuează. Sînt prezente de asemenea date privind aspectele dinamice ale funcțiunilor celulare, obținute prin determinarea unor substanțe fluorescente în celule individuale. Autorii consideră că metoda citofluorometriei de fluorescență devine tot mai mult una din tehnicile de perspectivă ale analizei cantitative în biologia moleculară și în medicină.

Lucia Doina Popov

CURRENT TOPICS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY (Tehnici curente în microbiologie și imunologie). Vol. 82, de A. Fragaeus, R. Norberg, L. Kariäinen, H. Söderlung, K. Zechel și R. M. Zinkernagel, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York; 1978, 138 p., 13 fig., 32,50 $.

Prezentul volum conține patru lucrări, dintre care prima și ultima tratează chestiuni de imunologie, în timp ce a doua și a treia prezintă chestiuni care privesc mai degrabă acizii nucleici.

Prima lucrare, intitulată *Anticorpi anti-actinici*, prezintă o problemă de mare importanță teoretică și practică, deoarece este foarte interesant de știut în ce scop ar apărea într-un organism anticorpi tocmai împotriva unui compus așa de necesar vieții animalelor cum este actina. Semnificația unui asemenea proces în afara situației fiziologice este deosebit de mare pentru patologie unde, în afara unei explicații, deschide perspectiva soluționării unei foarte grave probleme: tratamentul maladiilor în care apar anticorpi anti-actină. De asemenea se rezolvă și problema diagosticului unor asemenea maladii, prin prezentarea unor tehnici imunochimice de diagnostic. Problemele sînt prezentate critic, uneori cu concluzii deosebit de interesante. Este cazul comparației anticorpilor anti-actinici de origine umană și animală (iepure).

Cea de-a doua lucrare, *Structura și replicarea virușilor*, prezintă problema „biologiei" unei clase relativ restrînse de viruși de o deosebită importanță pentru succesiunea de gazde pe care o necesită. Replicarea este tratată foarte amănunțit și sistematic, prezentînd: creșterea virusului, sinteza RNA viral în celula gazdei, sinteza proteinei virale în celula gazdei, asamblarea capsidei, asamblarea anvelopei virale și maturarea virușilor.

Inițierea sintezei ADN prin ARN, cel de-al treilea capitol, prezintă o problemă de mare importanță teoretică, deoarece sinteza ARN inițiată de ADN este normală, în timp ce evenimentul invers este mult mai rar și presupune un mecanism interesant. Cele mai importante probleme expuse în această lucrare sînt: existența unor mecanisme de sinteza ADN implicînd ARN ca modele, dovezi pentru inițierea sintezei ADN prin ARN, structura ARN care are funcție de inițiator al sintezei ADN etc.

Cea de-a patra lucrare, *Speculații asupra rolului antigenilor de transplantare în imunitatea mediată celular contra paraziților intracelulari*, este deosebit de interesantă prin problemele pe care le implică. De exemplu problema antigenilor H2 interesează în mod foarte direct subiectul prezentei lucrări. Problema este tratată și din punct de vedere genetic, ceea ce face ca explicarea unor aspecte să beneficieze de progresele acestui domeniu (genetica). Lucrarea este foarte concentrată, însă deosebit de limpede expusă, deși materialul ilustrativ lipsește. Toate lucrările prezintă o bogată literatură (selectată).

Mihai Zamfir

REVIEWS OF PHYSIOLOGY, BIOCHEMISTRY AND PHARMACOLOGY (Referate de Fiziologie, biochimie și farmacologie), Vol. 83, de E. M. Wright, L. B. Cohen, B.M. Salzberg, L. Glaser și P. Propping; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York; 1978, 196 p., 45 fig., 39,00 $.

Volumul conține patru lucrări, dintre care primele trei au caracter de fiziologie, iar cea de-a patra de farmacologie. În toate aceste lucrări problemele sînt abordate prin biochimie și biofizică la nivelul celor mai fine structuri, adesea subcelulare. Lucrările prezentate încearcă de cele mai multe ori tratarea fenomenelor fiziologice prin modele. Pentru aceasta autorii caută mijloacele de maximă relevanță, selectînd acele tehnici a căror aplicare să permită obținerea rezultatelor cu cel mai mic risc de interpretare eronată și stabilirea unor concluzii cu mari șanse de a reflecta realitatea proceselor fiziologice discutate. Una dintre aceste metode este microscopia fotonică și electronică, prin a cărei manevre autorii urmăresc evoluția celulelor în cursul fenomenelor cercetate.

Prima lucrare, *Procese de transport în formarea fluidului cerebrospinal*, privește evoluția componentelor lichidului cerebrospinal, de la secreție pînă la realizarea tuturor funcțiilor sale. Sînt comentate componentele cele mai importante, împreună cu evenimentele fiziologice la a căror realizare ele concură. Sînt abordate unele fenomene care, deși cunoscute, continuă să necesite încă multe precizări, unul de acest fel fiind bariera creier-sînge. Sînt prezentate și structurile anatomice implicate în evoluția fluidului cerebrospinal, cea mai importantă fiind plexul choroid în care are loc formarea sa. Fenomenele de transport sînt prezentate în strînsă legătură cu structura formațiunilor traversate, făcîndu-se chiar precizări cantitative, legate de fiziologia procesului. Un asemenea caz este acela al mitocondriilor plexului choroid din care se evaluează, ca repartizate în epiteliu, circa 80—85%.

Pătrunderea pasivă a ionilor, pătrunderea neelectroliților, a unor micromolecule de interes metabolic imediat (aminoacizi, zaharuri etc.) sînt comentate amănunțit împreună cu inhibitori, promotori, energetică, potențiale, gradienți și tot ce ar putea contribui la înțelegerea fenomenului. Imaginea finală este cea statistică a unui fluid „mediu" rezultat a numeroase echilibre dinamice și susținînd, la rîndul său, numeroase funcții cu o dinamică abundentă.

Cea de-a doua lucrare, *Măsurarea optică a potențialului de membrană*, este o lucrare de fiziologie în care se analizează perspectivele unei metode biofizice. De fapt este o tentativă de măsurare a potențialelor de membrană prin intermediul efectelor optice asociate, în cazurile în care întrebuințarea electrozilor este atît de perturbativă încît aplicarea lor nu ar fi compatibilă cu fiziologia normală a celulelor. Pentru a se realiza o asemenea tentativă sînt studiați unii coloranți din punctul de vedere al variației spectrului lor la aplicarea lor pe membrane ce sînt supuse unor anumite potențiale. Sînt prezentate atît inconvenientele metodei cît și posibilitățile de aplicare la diverse tipuri de celule animale (mușchi, celule roșii etc.), bacteriene etc.

Cea de-a treia lucrare, *Studii de adeziune celulă-celulă cu celule embrionale și în culturi*, privește o problemă de fiziologie de cea mai mare importanță și de mare dificultate, dar cu importanță teoretică în fiziologie: relația dintre celule în cadrul unui țesut. Lucrarea prezintă un corolar practic: izolarea componentelor adezive ale suprafețelor celulare. Sînt de asemenea prezentate bazele metabolice ale proceselor adeziunii celulare.

Cea de-a patra lucrare, intitulată *Farmacogenetică*, privește individualitatea biochimică a organismelor față de felurite medicamente. Sînt prezentate diferitele clase de medicamente, selectîndu-se compușii cei mai semnificativi și, în paralel, se prezintă unele chestiuni de genetică implicate în răspunsurile organismelor la aplicarea acestor compuși. Este vizată genetica umană, căci lucrarea are și scopuri practice, dintre care principalul este securitatea omului la administrarea medicamentului.

Mihai Zamfir-Grigorescu

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale la nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : Viaţa ştiinţifică, în care prin note scurte sînt aduse la cunoştinţă cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc., Recenzii, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 30 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii, etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie: 78171 Bucureşti 2, P. O. B. 1002.

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA
ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

V. I. DEACIUC, *Reglarea celulară a metabolismului glucozei şi acizilor graşi*, 1973, 255 p., 10,50 lei.

CRISTOFOR SIMIONESCU, VIORICA RUSAN şi VALENTIN POPA, *Chimia algelor marine*, 1974, 212 p., 18 lei.

D. A. ABRAHAM, *Mecanismul de acţiune al hormonilor steroizi*, 1975, 184 p., 13 lei.

EMIL POP şi RADU CODREANU, *Istoria ştiinţelor în România. Biologia*, 1975, 287 p., 13,50 lei.

ELENA GABRIELESCU, *Neuroproteazele*, 1978, 157 p., 22 lei.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 22, NR. 1, P. 1—96, BUCUREŞTI, IANUARIE — IUNIE, 1979

I. P .I. c. 1089

43816

Lei 20

F 1330

studii şi cercetări de biochimie

2

TOMUL 22

1979

IULIE — DECEMBRIE

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 22, nr. 2, p. 97—244, 1979, Bucureşti

SCBIAS—22 (2), (1979)

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

Academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

CECILIA MOTAȘ

Revista apare de 2 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 40 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții. Revista se poate procura (direct sau prin poștă) și prin PUNCTUL DE DESFACERE din cadrul Editurii Academiei.

Cititorii din străinătate se pot abona adresîndu-se la ILEXIM, Departamentul Export-Import Presă, P.O. Box 136—137 telex: 11226, București, str. 13 Decembrie nr. 3.

Manualele cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență, se vor trimite pe adresa Comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie": București, P.O. Box 2—2, 78171 București 2, România.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

București, Calea Victoriei nr. 125, sectorul 1, cod 71021.

1980 JAN 3

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tomul 22, nr. 2 1979

SUMAR

Dr. docent LYDIA MESROBEANU 101

Dr. TRAIAN RĂDULESCU 117

MARIA ANDRAŞ, VICTORIA DOBRE, Diferenţierea electroforetică a mucopolizaharidelor din urină 121

SMARANDA CONSTANTINESCU, G. ROTARU, GABRIELA FILIPESCU, B. BARHAD, I. LĂZĂRESCU, Cercetări privind influenţa polyvinilpyridin-N-oxidului asupra unor enzime mitocondriale în etapele precoce ale silicozei experimentale 125

V. DARIE, M. ŞERBAN, Comportarea fosfatazelor alcaline şi acide hepatice în diabetul aloxanic 133

ILEANA FUNDUC, R. CIUPE, E. FĂGĂRĂŞAN, Relaţii între concentraţia acizilor biliari şi capacitatea litogenă a bilei umane 137

VIORICA GORCEA, ELENA BISTRICEANU, DESPINA COCORA, Repercusiunile abuzului de alcool asupra stării de nutriţie tiaminică 143

ELENA GANEA, CECILIA MOTAŞ, Metode de decelare a SIgA în materiile fecale 149

M. A. MATEESCU, CLAUDIA-EVELINA BUDU, Efectul rogorului (Fosfotox R) asupra activităţii peroxidazei purificate din hrean *(Armoracia rusticana)* 155

CORINA MIHAIL, CECILIA MOTAŞ, Rolul părţii glucidice în degradarea intracelulară a proteinelor. VIII. Degradarea IgM cu catepsina B_1 umană în prezenţa şi absenţa unui amestec glicozidazic din *Streptomyces griseus* . . 163

G. NEAMŢU, GH. ILLYES, T. LÁSZLO. Cercetări chemotaxonomice la plante superioare. XIII. Pigmenţii carotenoidici şi clorofilieni din *Chelidonium majus* L. 175

GR. POPA, ILEANA FUNDUC, Metode utilizate în analiza unor componente ale bilei umane 181

H. D. SCHELL, OFELIA GOZIA, Caracterizarea fizico-chimică a unui preparat imobilizat de L-alanin--2-oxoglutarat aminotransferază din ficat de şobolan 187

N. STĂNCIOIU, SIMONA CEAUŞESCU, Dozarea radioimunologică a 17-β-estradiolului şi progesteronului din sîngele găinilor ouătoare întreţinute în adăposturi cu regim de lumină diferit 195

M. ŞERBAN, AURICA CARAMETE, LIDIA RĂDULESCU, EVA DIACONESCU, DOMNICA RUGHINIŞ, Efectul naturii şi cantităţii reziduurilor de erbicide asupra indicilor biochimici de calitate la unele soiuri de mere 199

M. TĂMAȘ, I. MARINESCU, FLORENTINA IONESCU, Flavonoidele din mugurii de plop 207

C. VLĂDESCU, CEZARINA CUCU, MARGARETA ȘERBAN, Purificarea albuminei serice în scopul utilizării ei ca reactiv în tehnica lipidogramei 215

REFERAT GENERAL

S. COMOROȘAN, ELENA ALEXANDRESCU, S. CINCA, DOMNIȚA CRIȘAN, M. HRISTEA, LILIANA PÎSLARU, VESELCA POPESCU, V. TIRON, SILVIA VIERU, Sugestii pentru o spectroscopie biologică 219

RECENZII 237

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tome 22, no. 2 1979

JULY—DECEMBRE

CONTENTS

Dr. docent LYDIA MESROBEANU 101

Dr. TRAIAN RĂDULESCU 117

MARIA ANDRAŞ, VICTORIA DOBRE, Electrophoretic patterns of urine mucopolysaccharides 121

SMARANDA CONSTANTINESCU, G. ROTARU, GABRIELA FILIPESCU, B. BARHAD, I. LĂZĂRESCU, Investigations on the action of polyvinyl-pyridine-N-oxide on several mitochondrial enzymes in early stages of experimental silicosis 125

V. DARIE, M. ŞERBAN, Le comportement des phosphatases alcaline et acide hépatique dans le diabète alloxanique 133

ILEANA FUNDUC, R. CIUPE, E. FĂGĂRĂŞAN, Relationships between the concentration of biliary acids and the lithogenous capacity of the gall . . 137

VIORICA GORCEA, ELENA BISTRICEANU, DESPINA COCORA, Les répercussions de l'abus d'alcool sur l'état de nutrition thiaminique . . . 143

ELENA GANEA, CECILIA MOTAŞ, Methods for SIgA determination in feces 149

M. A. MATEESCU, CLAUDIA EVELINA BUDU, The influence of Rogor (Dimethoate) on the purified horse radish peroxidase 155

CORINA MIHAIL, CECILIA MOTAŞ, The role of carbohydrate moiety in the intracellular degradation of glycoproteins. VIII. Human cathepsin B_1 hydrolysis of IgM with and without a glycosidase mixture of *Streptomyces griseus* 163

G. NEAMŢU, GH. ILLYES, T. LÁSZLO, Chemotaxonomical researches in higher plants. XIII. Carotenoid and chlorophyll pigments from *Chelidonium majus* L. 175

GR. POPA, ILEANA FUNDUC, Methods used in the analysis of some components of human bile 181

H. D. SCHELL, OFELIA GOZIA, Physikalisch-chemische Charakterisierung eines trägergebundenen Praparates der L-Alanin-2-oxoglutarat Aminotransferase aus Ratten Leber 187

N. STĂNCIOIU, SIMONA CEAUŞESCU, The radioimmunological dosing of 17-β-oestradiol and progesterone in layers'blood kept in houses with different light conditions 195

M. ŞERBAN, AURICA CARAMETE, LIDIA RĂDULESCU, EVA DIACONESCU, DOMNICA RUGHINIŞ, The effects of the nature and size of herbicide residues on the biochemical quality indices of some apple varieties 199

N.TĂMAŞ, I. MARINESCU, FLORENTINA IONESCU, The flavonoids of poplar buds 207

C. VLĂDESCU, CEZARINA CUCU, MARGARETA ŞERBAN, La purification de l'albumine sérique en vue de son utilisation comme réactif pour la technique de lipidogrammes 215

GENERAL REVIEW

S. COMOROŞAN, ELENA ALEXANDRESCU, S. CINCA, DOMNIŢA CRIŞAN, M. HRISTEA, LILIANA PÎSLARU, VESELCA POPESCU, V. TIRON, SILVIA VIERU, Suggestions for biological spectroscopy 219

REVIEWS 237

NECROLOG

DR. DOC. LYDIA MESROBEANU

(1908—1978)

De curînd s-a împlinit un an de la brusca şi negîndita încetare din viaţă a dr. doc. Lydia Mesrobeanu, biolog şi imunochimist, om de ştiinţă de renume mondial, care a contribuit în mod remarcabil la promovarea ştiinţei româneşti pe plan internaţional. Activitatea ştiinţifică a Lydiei Mesrobeanu este legată în mod prioritar de izolarea şi identificarea unei lungi serii de toxine bacteriene, de precizarea structurii şi funcţiei acestora, de prelucrarea lor în scopuri imunoprofilactice.

St. cerc. biochim., 22, *2*, 101—115 (1979)

Lydia Mesrobeanu s-a născut în București, la 20 iunie 1908. Tatăl, Albert Lorenz, a fost avocat, iar mama, Aneta, născută Brenck, a fost casnică.

În 1931, Lydia Mesrobeanu a absolvit Facultatea de științe naturale din București și a intrat ca asistent universitar la Facultatea de medicină din București, Catedra de biochimie, al cărei conducător era profesorul André Boivin, originar din Franța. Între 1946 și 1952 a funcționat ca șef de lucrări la Catedra de bacteriologie (șef de catedră : prof. M. Ciucă) a Facultății de Medicină din București, iar din 1949 a lucrat ca Director de secție la Institutul de microbiologie, epidemiologie și parazitologie „Dr. I. Cantacuzino" din București. În perioada 1949—1959 a funcționat și ca șef de secție în colectivul Academiei Republicii Populare Române pentru studiul temei „antibiotice și variațiune microbiană".

Între 1936 și 1938, timp de doi ani, a făcut specializare în chimie biologică și fiziologie bacteriană la Institutul „Louis Pasteur" din Paris, și, în continuare, alte trei luni la „National Institute for Medical Research" din Londra.

La 20 iunie 1936 a obținut titlul de doctor în științe naturale la Facultatea de științe a Universității din Strasbourg, Franța. Pentru decernarea titlului, Lydia Mesrobeanu a prezentat două teze, intitulate : (*1*) *Les antigènes glucido-lipidiques des bactéries. Étude chimique et biologique;* și (*2*) *Contribution à l'étude des corps puriques de la cellule bactérienne.* Aceste lucrări au fost dedicate : (*a*) memoriei profesorului Ioan Cantacuzino, întemeietorul institutului care îi poartă numele și în care dr. Lydia Mesrobeanu și-a desfășurat activitatea ; (*b*) profesorilor C. Ionescu-Mihăiești și Mihai Ciucă, directori în funcție ai Institutului „Dr. I. Cantacuzino" ; și (*c*) profesorului A. Boivin, șeful catedrei de biochimie și îndrumătorul științific al doctorandei în acea perioadă.

În dedicația formulată profesorului A. Boivin, dr. Lydia Mesrobeanu subliniază că îi datorează acestuia ceea ce este mai bun din formația sa științifică. Într-adevăr, perioada de inițiere în cercetarea științifică și primele rezultate deosebite ale Lydiei Mesrobeanu sînt realizate sub îndrumarea directă a profesorului A. Boivin. Între 1933 și 1935, Lydia Mesrobeanu publică primele 27 de lucrări din cariera sa științifică, toate împreună cu A. Boivin ; această colaborare continuă practic neîntrerupt pînă în 1940, cînd războiul îl reține definitiv pe prof. Boivin în Franța.

Încă de la începutul activității sale științifice, datorită colaborării cu prof. A. Boivin și preocupărilor științifice dominante din Institutul „Dr. I. Cantacuzino" unde își desfășura activitatea, problemele luate în studiu de dr. Lydia Mesrobeanu au fost orientate către toxinele și antigenele bacteriene. Activitatea asiduă pe care a desfășurat-o timp de peste 45 de ani în acest domeniu a dat roade deosebite încă de la început : în 1933, alături de A. Boivin și împreună cu soțul său, prof. dr. Ion Mesrobeanu, Lydia Mesrobeanu contribuie la descoperirea primului antigen „complet" bacterian, antigenul glucidopeptidolipidic sau endotoxina termostabilă a bacteriilor Gram-negative. Acest preparat, recunoscut pe plan mondial sub denumirea de „antigen Boivin-Mesrobeanu", a constituit pînă de curînd singura substanță extrasă din bacterii și dotată cu caracter dublu, de antigen și de toxină, fiind capabilă și să asigure protecție imună contra

infecţiilor cu bacterii Gram-negative. Din punct de vedere imunochimic, substanţa este constituită din patru fragmente cu structură distinctă: polizaharid-lipid A-peptid-lipid B. Fracţiunea polizaharidică asigură specificitatea antigenică şi termostabilitatea produsului; prezenţa peptidului intensifică capacitatea sa imunogenă; iar fosfolipidul A îi conferă capacitate adjuvantă. Polizaharidul şi lipidul A constituie „lipopolizaharidul", mitogen pentru limfocitele B, inductor al reacţiilor de tip Schwartzman şi cu acţiune hipersensibilizantă.

Studiile privind endotoxinele bacteriene au fost continuate de dr. Lydia Mesrobeanu, neîntrerupt, pînă în 1978, moment în care neaşteptata sa moarte a lăsat aceste cercetări în plin program de dezvoltare a lor. Aceasta întrucît, pe lîngă endotoxina termostabilă descrisă iniţial în 1933, Lydia Mesrobeanu a înscris şi alte remarcabile descoperiri.

Astfel, între 1937 şi 1940, împreună cu A. Boivin, descrie „dualitatea" toxinelor de *Shigella dysenteriae* (b. Shiga): o endotoxină termostabilă, enterotropă, şi o exotoxină termolabilă, neurotropă. Endotoxina obţinută din tulpinile „smooth" de b. Shiga are structura chimică a antigenelor Boivin-Mesrobeanu, cu un poliozid specific de tip, care este absent la formele „rough". Neurotoxina termolabilă are structură proteică şi a fost ulterior purificată de către Van Heyningen.

Începînd cu 1961, într-o lungă suită de articole împreună cu prof. I. Mesrobeanu, Lydia Mesrobeanu expune rezultatele privind descoperirea unei noi familii de toxine: *neurotoxinele* sau *endotoxinele termolabile* ale bacteriilor Gram-negative. Endotoxinele termolabile au fost obţinute prin precipitare cu acid tricloracetic din supernatantul autolizatelor de diverse bacterii Gram-negative *(Salm. typhimurium*, S şi R, *Escherichia coli*, *B. proteus*, *Ps. pyocyaneus*, *Agrobacterium tumefaciens* etc.) La animalul de experienţă, neurotoxinele provoacă fenomene similare cu cele induse de neurotoxina b. Shiga. Se pot cupla cu limfocite din ganglioni limfatici de maimuţă, stimulînd efectul citopatic al acestora. Sînt capabile să inducă tumori pe tulpinile unor plante. Au fost izolate din urina bolnavilor cu infecţii urinare cu bacili Gram-negativi.

În mod similar cu colicinele K, neurotoxinele au activitate bactericidă, dar nu numai asupra Gram-negativilor, în general, ci şi chiar asupra tulpinei bacteriene omoloage. Capacitatea lor bactericidă a fost găsită de Lydia Mesrobeanu ca fiind abolită prin încălzire la 65° sau după acţiunea enzimelor proteolitice ori a formaldehidei, ceea ce demonstrează că potenţialul lor bactericid este legat de partea proteică a moleculei de neurotoxină. Fracţiunea proteică, izolată cu fenol 54% la 68° şi precipitare cu alcool, s-a dovedit bactericidă, activitate care a fost neutralizată cu seruri imune obţinute nu numai cu neurotoxina ci şi cu endotoxina termostabilă sau cu proteina acesteia. S-au evidenţiat astfel o serie de structuri comune între endotoxina termostabilă şi bactericidă (neurotoxina) şi proteina nebactericidă extrasă din endotoxina termostabilă.

Ca o recunoaştere a aportului prioritar şi esenţial la descoperirea şi studiul neurotoxinelor şi endotoxinelor termostabile bacteriene, dr. Lydia Mesrobeanu a fost invitată să prezinte rezultatele obţinute în aceste domenii la mai multe conferinţe şi congrese internaţionale, de asemenea, i-au fost publicat capitole speciale dedicate acestor probleme în monografii internaţionale despre toxinele bacteriene.

În strînsă legătură cu preocuparea constantă privind endotoxinele, dr. Lydia Mesrobeanu a cercetat în detaliu activităţile diferitelor toxine bacteriene asupra proceselor de *pinocitoză leucocitară*: influenţa fagocitozei asupra metabolismului leucocitar (1957 —1959), acţiunea neurotoxinelor asupra leucocitelor (1962), pinocitarea exotoxinelor de către leucocite (1966), citochimia şi citoenzimologia fagocitozei sub acţiunea endo- şi neurotoxinelor (1963 —1970) etc.

De asemenea, precizează imunogenicitatea fracţiilor lizosomale preparate din leucocite ce au pinocitat endotoxina (1970). Împreună cu R. Robineaux, publică (1970) un raport detaliat asupra rolului biologic al RNA-imunogen de origine macrofagică.

Dintre enzimele lizosomale leucocitare, a acordat o atenţie specială lizozimului, încă din 1938, cînd — împreună cu O. Noeppel — a publicat prima revistă a lucrărilor privind această hidrolază a peretelui bacterian. Ulterior, obţine cristalizarea lizozimului şi îi determină activitatea asupra diferitelor tipuri de stafilococi (1950).

Rezultatele remarcabile obţinute de dr. Lydia Mesrobeanu în domeniul toxinelor bacteriene nu au rămas numai la nivel teoretic, ci autoarea a depus eforturi susţinute pentru valorificarea lor în practică. În acest sens, întreprinde studii experimentale pentru realizarea vaccinului TAB adsorbit pe suporturi minerale (1952 —1957), pentru concentrarea şi purificarea anatoxinei stafilococice (1952), pentru realizarea anatoxinei difterice precipitată (1955), pentru purificarea şi concentrarea toxinei Dick (1955), pentru prepararea de vaccinuri dizenterice polivalente cu extracte bacteriene adsorbite pe suport mineral (1958) etc. Obţine purificarea parţială a anatoxinei şi alfa-toxinei stafilococice (1960), pune la punct metode pentru purificarea şi cristalizarea toxinei Dick (1965), pentru concentrarea şi purificarea streptokinazei (1965), pentru cristalizarea acesteia (1966), pentru purificarea streptolizinei O (1958 —1970) etc. Toxinele şi anatoxinele purificate şi cristalizate au fost caracterizate chimic şi imunochimic de colective conduse de dr. Lydia Mesrobeanu.

Preocuparea constantă pentru lărgirea cunoştinţelor asupra diferitelor produse de origine atît bacteriană, virală, parazitară, dar şi de la organisme superioare, dotate cu calităţi antigenice, a contribuit la redactarea, împreună cu dr. Eug. Păunescu, a capitolelor despre antigene din tratatele de imunologie publicate relativ recent (1968 şi 1975).

În cadrul vastului program de cercetare abordat în perioada cît a lucrat în Institutul „Dr. I. Cantacuzino", o atenţie specială a acordat compoziţiei şi preparării mediilor de cultură destinate producţiei de seruri şi vaccinuri. A publicat o monografie privind „mediile de cultură în microbiologia medicală" (1961) şi a întreprins studii pentru identificarea diferenţelor metabolice induse la *S. typhimurium* de tipul de peptonă prezentă în mediul de cultură (1958 —1960); a contribuit la realizarea de noi medii de cultură pentru creşterea şi izolarea cocilor patogeni (1969) etc.

În cadrul Colectivului Academiei R.S.R. pentru studiul problemei „antibiotice şi variaţiune microbiană", a coordonat, între 1949 şi 1952, cercetările privind modificările chimice, enzimologice şi imunochimice induse la stafilococ de dobîndirea penicilino-rezistenţei, studii deosebit de actuale în acel moment, de început al antibioterapiei, deoarece au contribuit la o mai bună cunoaştere a proceselor de instalare a chimiorezis-

tenței bacteriene și, implicit, la precizarea măsurilor de prevenire a instalării antibiorezistenței.

Abordarea biochimică variată a diferitelor aspecte morfofuncționale privind celula bacteriană, a condus pe dr. Lydia Mesrobeanu la o cunoaștere complexă și completă a acestui domeniu și i-a permis ca, împreună cu dr. Eug. Păunescu, să redacteze o monografie privind „Fiziologia bacteriană" (1960). Lucrarea a fost apreciată în mod deosebit: a fost distinsă cu premiul „Dr. V. Babeș" al Academiei Române și, în 1963, a fost reeditată în limba rusă.

Dr. doc. Lydia Mesrobeanu a fost nu numai un competent și rafinat om de știință, ci și un remarcabil profesor și îndrumător al mai multor generații de cercetători științifici. Față de cei care au avut norocul de a-i fi elevi și colaboratori, dr. Lydia Mesrobeanu a avut în mod constant multă grijă pentru dezvoltarea lor științifică, pentru aplicarea unui spirit de exigență deosebită în activitatea practică de fiecare zi, pentru formularea unei gîndiri analitice și critice activă, constructivă. O neștearsă amintire și o inegalabilă recunoștință îi poartă vechi colaboratori ca dr. doc. Natalia Mitrică și dr. Eug. Păunescu, ca și elevi și colaboratori mai noi ca A. Marks, Dana Movileanu, Dan Butur, Paula Pleșcaș și mulți alții.

Ca om de știință, ca dascăl și îndrumător, dr. Lydia Mesrobeanu a continuat și dezvoltat „spiritul cantacuzinist" al institutului unde s-a format, a lucrat și a obținut rezultate remarcabile timp de 45 de ani, și de care a fost ancorată prin toate legăturile ființei și remarcabilei sale inteligențe.

Dr. Eug. Păunescu
Institutul de ftiziologie
București

BIBLIOGRAFIE

1. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Contributions à l'étude de la composition chimique des bactéries. Substances azotées et phosphorées „acido-solubles".* C.R. Soc. Biol., 1933, *112*, 76.
2. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Contribuitons à l'étude de la composition chimique des bactéries. Les substances phosphorées au cour de l'autolyse bactérienne.* C.R. Soc. Biol., 1933, *112*, 611.
3. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Contributions à l'étude de la composition chimique des bactéries. Actions des électrolytes sur l'équilibre des substances phosphorées de la cellule bactérienne.* C.R. Soc. Biol., 1933, *112*, 1009.
4. A. Boivin, I. Mesrobeanu, L. Mesrobeanu — *Technique pour la préparation des polysaccharides microbiens spécifiques.* C.R. Soc. Biol., 1933, *113*, 490.
5. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Contributions à l'étude de la composition chimique des bactéries. Les dérivés de l'acide pyro-phoshorique dans la cellule microbienne* C.R. Soc. Biol., 1933, *114*, 305.
6. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Contributions à l'étude de la composition chimique des bactéries. Les corps puriques microbiens.* C.R. Soc. Biol., 1933, *114*, 302.
7. A. Boivin, I. Mesrobeanu, L. Mesrobeanu — *Extraction d'un complexe toxique et antigénique à partir du bacille d'Aertrycke.* C.R. Soc. Biol., 1933, *114*, 307.
8. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Remarques concernant la technique d'extraction du complexe polysaccharidique antigénique renfermé dans le bacille d'Aertrycke.* C.R. Soc. Biol., 1934, *115*, 304.
9. A. Boivin, I. Mesrobeanu, L. Mesrobeanu, B. Nestorescu — *Extraction d'un complexe polysaccharidique toxique et antigénique à partir de diverses bactéries autres que le bacille d'Aertrycke.* C.R. Soc. Biol., 1934, *115*, 306.

10. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Sur la stabilité des complexes polysaccharidiques toxiques et antigéniques renfermés dans les bactéries.* C.R. Soc. Biol., 1934, *115*, 309.

11. A. Boivin, L. Mesrobeanu, I. Mesrobeanu — *Sur la teneur du bacille d'Aertrycke en, substances polysaccharidiques spécifiques et antigéniques.* C.R. Soc. Biol., 1934, *117*, 271.

12. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Sur l'action hyperglycémiante du complexe toxique, spécifique et antigénique isolé à partir du bacille d'Aertrycke.* C.R. Soc. Biol., 1934, *117*, 273.

13. A. Boivin, L. Mesrobeanu, I. Mesrobeanu — *Sur les propriétés toxiques et immunisantes d'une substance isollée du bacille d'Aertrycke.* C.R. Ac. Sc., 1934, *198*, 2124.

14. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Contributions à l'étude de la composition chimique de la cellule bactérienne. Substances azotées et phosphorées „acido-solubles". (Techniques et premiers résultats).* Arch. Roum. Path. Exp. Microbriol., 1934, *7*, 95.

15. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Sur les propriétés chimiques d'une substance toxique et immunisante isolée du bacille d'Aertrycke.* C.R. Ac. Sci., 1934, *198*, 2211.

16. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Recherches sur les antigènes somatiques et sur les endotoxines des bactéries. I. Considérations générales et exposé des techniques utilisées.* Rev. Immunol., 1935, *1*, 553.

17. A. Boivin, M. Marbé, L. Mesrobeanu, P. Juster — *Sur l'existence, dans le Bacillus tumefaciens d'une endotoxine capable de provoquer la formation de tumeurs chez les végétaux.* C.R. Ac. Sci., 1935, *201*, 984.

18. A. Boivin, L. Mesrobeanu, I. Mesrobeanu — *Préparation et propriétés biologiques d'une substance nonprotéique, à la fois toxique spécifique et immunisante du bacille d'Aertrycke et du bacille de Gartner et manquant dans les formes R des mêmes bactéries.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1935, *8*, 45.

19. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Sur la composition chimique comparée des formes S et R du bacille d'Aertrycke et du bacille de Gartner.* C.R. Soc. Biol., 1935, *118*, 727.

20. A. Boivin, L. Mesrobeanu — Sur *l'existence, dans la formes S et R du bacille d'Aertrycke et du bacille de Gärtner d'une diastase clivant l'antigène „complet" avec libération d'antigène „résiduel".* C.R. Soc. Biol., 1935, *118*, 1671.

21. A. Boivin, L. Mesrobeanu, I. Mesrobeanu — *Contribution à l'étude de la spécificité microbienne. Antigènes „complets" et „residuels".* XV Intern. Physiol. Congr., Leningrad-Moscow, 1935. Summ. Communic., p. 38.

22. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Sur l'utilisation de l'antigène „complet" par le bacille d'Aertrycke vivant.* C.R. Soc. Biol., 1935, *119*, 209.

23. A. Boivin, L. Mesrobeanu, G. Magheru, A. Magheru — *Recherches biologiques et chimiques sur l'antigène somatique „complet" renfermé dans quelques colibacilles.* C.R. Soc. Biol., 1935, *120*, 1276.

24. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Sur les substances spécifiques renfermées dans le bacille d'Aertrycke et dans le bacille de Gärtner. Antigène „complet" et antigènes „résiduels".* C.R. Soc. Biol., 1935, *118*, 612.

25. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *L'antigène „complet", constituants acidosolubles de l'endotoxine renfermée dans les formes S du bacille d'Aertrycke et du bacille de Gärtner.* C.R. Soc. Biol., 1935, *118*, 614.

26. G. Magheru, A. Magheru, A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Recherches sur l'antigène „résiduel" des colibacilles.* C.R. Soc. Biol., 1935, *120*, 1279.

27. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Sur la présence d'antigène „complet" et d'antigène „résiduel" dans diverses bactéries.* C.R. Ac. Sci., 1935, *201*, 168.

28. M. Ciuca, L. Mesrobeanu, G. Badenski — *Variantes microbiennes du bacille d'Aertrycke et variabilité possible dans la constitution chimique de l'antigène somatique complet de ce germe.* C.R. Ac. Sci., 1936, *202*, 1314.

29. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Variations bactériennes et antigène somatique O complet.* C.R. Ac. Sci., 1936, *203*, 1402.

30. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Recherches sur les antigènes somatiques et sur les endotoxines des bactéries. II. L'antigène somatique complet (antigène O) de certaines bactéries est le constituent principal de leur endotoxines.* Rev. Immunol., 1936, *2*, 113.

31. L. Mesrobeanu — *Les antigènes glucido-lipidiques des bactéries. (Etudes chimiques et biologiques).* Thèse Dr. Sciences-Strasbourg, 1936 ; Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1936, *9*, 1.

32. L. Mesrobeanu — *Contribution à l'étude des corps puriques de la cellule bactérienne.* Thèse Dr. Sciences-Strasbourg, 1936 ; Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1936, *9*, 121.

33. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Les endotoxines bactériennes. Récentes acquisitions dans nos connaissances sur leur nature chimique et sur leur propriétés biologiques.* Presse Méd., 1936, no. 99, 1995.
34. A. Boivin, L. Mesrobeanu, G. Magheru, A. Magheru — *Sur les rapports existant entre l'aspect des colonies données par les colibacilles et la présence ou l'absence d'antigène somatique „complet" dans ces bactéries.* C.R. Soc. Biol., 1936, *121*, 169.
35. G. Magheru, A. Magheru, A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Rercherches sur l'endotoxine des colibacilles.* C.R. Soc. Biol., 1936, *121*, 172.
36. G. Calalb, L. Mesrobeanu — *Sur l'antigène somatique glucido-lipidiques des bacilles dysentériques. Propriétés toxiques et spécifiques.* C.R. Soc. Biol., 1936, *122*, 498.
37. L. Mesrobeanu, G. Calalb — *Sur l'antigène somatique glucido-lipidiques des bactéries dysentériques. Propriétés chimiques.* C.R. Soc. Biol., 1936, *122*, 496.
38. L. Mesrobeanu, A. Boivin — *Recherches sur les toxines des bacilles dysentériques. Sur les principes toxiques thermostables des corps bactériennes du bacille de Shiga.* C.R. Soc. Biol., 1937, *124*, 439.
39. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Recherches sur les toxines des bacilles dysentériques. Sur la nature et sur les propriétés biologiques des principes susceptibles de se rencontrer dans les filtrats des cultures sur bouillon du bacille de Shiga.* C.R. Soc. Biol., 1937, *124*, 442.
40. Gh. Istrati, L. Mesrobeanu, O. Dimitriu — *Recherches sur les variantes du pnéumocique de type I, obtenues en cultures de bouillon — immun-sérum homologue.* C.R. Soc. Biol., 1937, *124*, 485.
41. Gh. Istrati, O. Dimitriu, L. Mesrobeanu — *Recherches sur la reversibilité des pneumocoques de formes R en S.* C.R. Soc. Biol., 1957, *124*, 487.
42. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Recherches sur les toxines des bacilles dysentériques. III. Sur les principes toxiques du bacille de Flexner.* C.R. Soc. Biol., 1937, *124*, 1078.
43. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Sur le pouvoir protecteur antitoxique des sérums obtenus en injectant à l'animal des endotoxines glucido-lipidiques* C.R. Soc. Biol., 1937, *124*, 1092.
44. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Sur les rapports existant entre la constitution chimique de l'antigène somatique des bactéries et la colorabilité de ces bactéries par la méthode de Gram.* C.R. Soc. Biol., 1937, *124*, 176.
45. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Sur l'antigène O. Endotoxines des Pyocianiques.* C.R. Soc. Biol., 1937, *125*, 273.
46. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Recherches sur les toxines des bacilles dysentériques. IV. Sur le pouvoir protecteur antitoxique des sérums obtenus en injectant à l'animal l'endotoxine — antigène O du bacille de Shiga et du bacille de Flexner.* C.R. Soc. Biol., 1937, *125*, 796.
47. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Sur la nature et les propriétés biologiques des toxines produites par les bacilles de Shiga et par le bacille de Flexner.* C.R. Ac. Sci., 1937, *204*, 302.
48. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Sur l'existence de toxine thermolabile et neurotrope (exotoxine) dans les corps bactériens du bacille de Shiga.* C.R. Ac. Sci., 1937, *204*, 1759.
49. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Recherches sur les antigènes somatiques et sur les endotoxines des bactéries. III. Antigène somatique O „complet" et variation bactérienne.* Rev. Immunol., 1937, *3*, 319.
50. G. Magheru, A. Magheru, A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Recherches sur l'antigène somatique complet (antigène O) des colibacilles.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1937, *10*, 29.
51. A. Boivin, L. Mesrobeanu, M. Marbé, P. Juster, L. Savulesco — *Sur la production des tumeurs chez la plante, au moyen de l'endotoxine nonprotéique du bacille tumefaciens.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1937, *10*, 67.
52. L. Mesrobeanu — *Quelques considérations sur la spécificité serologique des levures. (Revue critique).* Ann. Ferment., 1937, *3*, 281.
53. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Rercherches sur lee toxines des bacilles dysentériques sur l'exislance d'une principe toxique thermolabile neurotrope dans les corps bactériens du bacilles de Shiga.* C.R. Soc. Biol., 1937, *125*, 222.
54. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Recherches sur les toxines des bacilles dysentériques. Sur l'identité entre la toxine thermolabile et neurotrope des corps bactériens du bacille de Shiga et l'exotoxine du présente dans les filtrats de culture sur buillon de la même bactérie.* C.R. Soc. Biol., 1937, *126*, 323.
55. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Recherches sur les toxines de bacilles dysentériques. Sur la signification des toxines produites par le bacille de Shiga et par le bacille de Flexner.* C.R. Soc. Biol., 1937, *126*, 652.

56. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Recherches sur la nature chimique et sur les propriétés biologiques des antigènes somatiques et des toxines des bactéries.* VI[-e] Congr. Chimie Biologique, Lyon, 1937.

57. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Recherches sur les antigènes somatiques et sur les endotoxines des bactéries. IV. Sur l'action anti-endotoxique de l'anticorps O.* Rev. Immunol., 1938, *4*, 40.

58. A. Boivin, L. Mesrobeanu, Y. Izard — *Sur la séparation, par voie chimique, des endotoxines glucido-lipidiques et des exotoxines protéiques.* C.R. Soc. Biol., 1938, *127*, 651.

59. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Sur l'action antiendotoxique de l'anticorps O, formé dans l'organisme, en réponse de l'injection d'un antigène glucido-lipidique (antigène O).* C.R. Soc. Biol., 1938, *127*, 752.

60. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Sur l'action antiinfectieuse de l'anticorps O formé dans l'organisme en réponse à l'injection d'un antigène glucido-lipidique (antigène O).*, C.R. Soc. Biol., 1938, *127*, 755.

61. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Le endotossine batteriche. Progressi recenti nelle nostre conoscenze sulla loro natura chimica e le loro proprieta biologiche.* GiornBatt. Immunol., 1938, *20*, 516.

62. M. Ciuca, L. Mesrobeanu, A. Badenski, G. Munteanu — *Sur la structure antigènique des souches de Proteus X et sur le rôle de leur antigène glucido-lipidique dans la réaction Weil-Félix.* C.R. Soc. Biol., 1938, *127*, 1414.

63. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Recherches sur les antigènes somatiques du bacille typhique. Sur la nature chimique des antigènes „O" et „Vi".* C.R. Soc. Biol., 1938, *128*, 5.

64. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Recherches sur les antigènes somatiques du bacille typhique. Sur quelques propriétés biologiques comparées des antigènes „O" et „Vi".* C.R. Soc. Biol., 1938, *128*, 9.

65. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Sur la nature chimique et sur les propriétés biologiques de l'antigène Vi du bacille typhique.* C.R. Acad. Sci, 1938, *206*, 1416.

66. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Recherches sur les antigènes somatiques et sur les endotoxines des bactéries. V. Sur le pouvoir vaccinant de l'antigène O et sur l'action anti-infectieuse de l'anticorps, O.* Rev. Immunol., 1938, *4*, 197.

67. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Sur la spécificité qui se manifeste dans l'action immunisante antiinfectieuse des antigènes glucido-lipidiques.* C.R. Soc. Biol., 1938, *128*, 358.

68. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Recherches sur les toxines des bacilles dysentériques. Sur les rapports qui existent entre la présence d'antigène glucido-lipidique chez le bacille de shiga et la virulence et le pouvoir vaccinant de cette bactérie.* C.R. Soc. Biol., 1938, *128*, 446.

69. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Recherches sur les antigènes somatiques au bacille typhique. Sur l'action immunisante anti-endotoxique des deux complexes glucido-lipidiques qui représent les antigènes O et Vi du bacille d'Eberth.* C.R. Soc. Biol., 1938, *128*, 835.

70. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Recherches sur les antigènes somatiques du bacille typhique. Sur l'action immunisante anti-infectieuse des deux complexes glucido-lipidiques qui représent les antigènes O et Vi du bacille d'Eberth.* C.R. Soc. Biol., 1938, *128*, 837.

71. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Les antigènes somatiques et flagellaires des bactéries.* I[-er] Congr. Int. Assoc. Microbiologistes de Langue Française, 1938, 27—29 oct, 53 pag.

72. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Recherches sur les antigènes somatiques et sur les endotoxines des bactéries. Sur la nature chimique et sur les propriétés biologiques des antigènes O et Vi du bacille typhique.* Rev. Immunol., 1938, *4*, 31.

73. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Sur la résistence à l'acide tricloracétique de l'antigène flagellaires (antigènes H) du bacille typhique et sur la nature chimique possible de cet antigène.* C.R. Soc. Biol., 1938, *129*, 136.

74. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Recherches sur les antigènes somatiques du bacille typhique. Sur l'action anti-infectieuse comparée des anticorps correspondent a deux qntigènes glucido-lipidiques O et Vi du bacille d'Eberth.* C.R. Soc. Biol., 1939, *130*, 683.

75. L. Mesrobeanu, O. Noeppel — *Revue des travaux sur le lysozyme.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1938, *11*, 247.

76. A. Boivin, L. Mesrobeanu — *Nature chimique et propriétes biologiques des antigènes somatiques du bacille d'Eberth.* III[-e] Congr. Int. Microbiol, New York, 1939.

77. A. D. Graf, L. Mesrobeanu — *Mikrochemische Analyse des Antyigenes des Bacillus Thyphosum murium (Aertrycke).* Klin. Wochenschr., 1940, *19*, 1167.

78. M. Ciuca, L. Mesrobeanu — *I. Sur la structure antigénique des variantes du bacille Proteus.* Bull. Sect. Sci. Acad. Roum., 1941, *23*, 310.

79. M. Ciucă, L. Mesrobeanu, A. Badenski, G. Munteanu, N. Paraschivescu — *L'antigène*

glucido-lipidique des Proteux X est le facteur responsable de la réaction Weil-Felix. Rev. St. Med., 1941, *30*, 107.

80. M. CIUCĂ, L. MESROBEANU, A. BADENSKI, M. FRANKE, E. MUNTEANU — *Contribuiton à l'étude de la toxicité de l'endotoxine glucido-lipidique du proteux X.* Rev. St. Med., 1941, *30*, 114.
81. L. MESROBEANU, C. DANIEL — *Action des rayons ultraviolets sur les bactéries. Contribution à l'étude de l'action des rayons ultraviolets sur les variantes microbiennes.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1942, *12*, 431.
82. N. NESTORESCU, L. MESROBEANU, B. A. THEODORESCO — *Contribution à l'étude de la structure antigénique du vibrion septique.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1942, *12*, 455.
83. M. CIUCA, L. MESROBEANU — *Contribution à l'étude de la variation microbienne. Structure antigénique du colibacille „Brx" et des ses variantes obtenus par l'action succesive du bactériophage et des sérums antilytiques.* Bull. Soc. Sci. Acad. Roum., 1943, *26*, 275.
84. L. MESROBEANU — *Contrbuioron à l'étude de la structure antigènique des monilias.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1943, *13*, 123.
85. M. CIUCĂ, L. MESROBEANU, S. STAMATESCO — *Contribution à l'étude de la variation dans le groupe de Salmonella. Variante huileuse obtenue par l'action du bactériophage.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1947, *14*, 5.
86. M. CIUCĂ, L. MESROBEANU, C. BARBER. — *Constitution chimique des variantes huileuses obtenues par l'action du bactériophage „AE" sur certaines souches de Typhimurium (Aertrycke).* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1947, *14*, 24.
87. L. MESROBEANU — *Noi cuceriri ale Biochimei. În jurul vizitei Prof. A. Boivin în România,* Natura, 1948, *37*, 105.
88. M. CIUCĂ L. MESROBEANU, P. CONSTANTINESCU — *Les deshydrases de Colibacille et du bacille d'Aertrycke ainsi que leur variantes provoquées par l'action du bactériophage spécifique.* Acad. R.P.R., Bull. Sect. Sti, 1948, *30*, 421.
89. L. MESROBEANU, E. DORIN, N. MITRICĂ — *Contribution à l'étude des phosphatases bactériennes. I. Les phosphomonoesterases.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1948, *15*,25.
90. L. MESROBEANU, N. MITRICĂ, E. PĂUNESCU — *Antibiotice şi variaţiune microbiană. Contribuţiuni la studiul variaţiunilor biochimice ale stafilococului auriu-Oxford sub influenţa penicilinei.* Bul. St. Acad. R.P.R., 1949, *1*, 205.
91. M. CIUCĂ, L. MESROBEANU, S. RUSS, N. MITRICĂ — *Antibiotice şi variaţiune microbiană. Cercetări comparate asupra variantelor „M" mucogene ale Bacilului Coli, obţinute sub influenţa streptomicinei şi bacteriofagului.* Bul. St. Acad. R.P.R., 1949, *1*, 327.
92. L. MESROBEANU, E. PĂUNESCU. N. MITRICĂ — *Antibiotice şi variaţiune microbiană. Contribuţiuni la studiul factorului de invazie la stafilococii normali şi penicilorezistenţi.* Bul. St. Acad. R.P.R., 1949, *1*, 333.
93. L. MESROBEANU, N. MITRICĂ — *Antibiotice şi variaţiune microbiană. Contribuţiuni la studiul deshidrazelor stafilococilor normali şi variantelor lor penicilino-rezistente.* Bul. St. Acad. R.P.R., 1949, *1*, 605.
94. L. MESROBEANU, N. MITRICĂ, E. PĂUNESCO — *Contribution à l'étude des variations biochimiques du staphylocoque doré sous l'influence de la penicilline.* — I-st Int. Congr. Biochem., Cambridge, Anglia, 1949, 444.
95. M. CIUCĂ, L. MESROBEANU, E. PĂUNESCU — *Lizosensibilitatea la fag a tulpinilor de stafilococ auriu şi a variantelor lor penicilino-rezistente.* Bul. Acad. R.P.R., Sect. B, 1950, *2*, 849.
96. G. CALALB, I. ARDELEANU, L. MESROBEANU, C. IENISTEA, T. GRIGORIU, V. DUMITRESCU, N. MITRICĂ, M. GARTNER, M. FONINO, GR. LĂZĂRESCU — *Cercetări asupra valorii imunizante a anatoxinelor difterice precipitante (A.P.T.), preparate în Inst. Cantacuzino, în comparaţie cu produse similare străine şi anatoxina Ramon.* Bul. St. Acad. R.P.R., 1950, *2*, 289.
97. L. MESROBEANU, I. MESROBEANU, N. MITRICĂ — *Antibiotice şi variaţiune microbiană. Acţiunea lizozimului cristalizat asupra stafilococilor penicilino-sensibili (auriu, citrin, alb) şi asupra variantelor penicilino-rezistente.* — Ses. Gen. St. Acad. R.P.R., iunie 1950.
98. L. MESROBEANU. N. MITRICĂ — *Metabolismul hidraţilor de carbon la variantele penicilino-rezistente ale stafilococului. Contribuţiuni la studiul asimilaţiei glucozei de către suspensiile de stafilococi penicilino-sensibili şi penicilino-rezistenţi.* Congr. Microbiol., Praga, Cehoslovacia, sept. 1950.
99. L. MESROBEANU, N. MITRICĂ — *Studiul comparativ al unor enzime la stafilococii penicilino-sensibili şi penicilino-rezistenţi.* Bul. Şt. Acad. R.P.R., 1951, *3*, 581.

100. L. MESROBEANU, N. MITRICĂ — *Cercetări asupra metabolismului azotului la stafilococit penicilino-sensibili şi variantele lor apenicilino-rezistente.* — St. Cercet. Inframicrobiol. Microbiol. Parazitol., 1951, *2*, 307.

101. M. CIUCĂ, L. MESROBEANU, S. RUSS, N. MITRICĂ — *Cercetări asupra unei variante mucogene de Escherichia coli, obţinută sub acţiunea streptomicinei.* St. Cercet. Microbiol. Epidemiol., 1952, *1*, 5.

102. G. MAGHERU, A. MAGHERU, Y. FAUR, P. BERCAN, L. MESROBEANU, N. MESROBEANU — *Contribuţiuni la studiul acţiunii imunizante a vaccinului TAB adsorbit pe alaun după metoda Larekovich-Rauss, precum şi a altor extracte lifice adsorbite şi neadsorbite.* St. Cercet. Microbiol. Epidemiol., 1952, *1*, 67.

103. L. MESROBEANU, E. PĂUNESCU, N. MITRICĂ — *Contribuţii la studiul elaborării hialuronidazelor bacteriene.* St. Cercet. Microbiol. Epidemiol., 1952, *1*, 135.

104. C. COMBIESCU, M. NICOLESCU, L. MESROBEANU, M. MITRICĂ — *Concentrarea şi purificarea anatoxinei stafilococice.* Rev. Igienă Microbiol. Epidemiol., 1952, *2*, 18.

105. L. MESROBEANU, N. MITRICĂ, E. RĂDULESCU — *Cercetări asupra modificărilor fizice şi metabolice la stafilococii penicilino-sensibili şi la variantele lor penicilino-rezistente.* St. Cercet. Inframicrobiol., Microbiol., Parazitol., 1952, *3*, 129.

106. M. CIUCĂ, L. MESROBEANU, E. PĂUNESCU — *Cercetări comparate asupra structurii antigenice la Streptococii penicilino-rezistenţi şi variantele lor penicilino-sensibile.* — — Bul. St. Acad. R.P.R., 1952, *4*, 7.

107. L. MESROBEANU, N. MITRICĂ, E. PODHORSKI — *Studiul răspîndirii histozimei la bacterii cu date asupra variaţiunii ei în raport cu penicilino-rezistenţa.* Bul. St. Acad. R.P.R., 1952, *4*, 195.

108. R. PORTOCALĂ, L. MESROBEANU, N. CAJAL, I. SCHWARTZ, N. MITRICĂ, E. PODHORSKI — *Dozarea acizilor nucleici în serul bolnavilor de hepatită epidemică sclerogenă.* St. Cercet. Inframicrobiol., Microbiol., Parazitol., 1953, *4*, 283.

109. L. MESROBEANU — *Proprietăţile antigenice ale substanţelor organice şi anorganice, cu moleculă mică şi funcţie de transportor a globulinelor în organism.* Rev. Igiene, Microbiol., Epidemiol, 1955, *4*, 3.

110. I. ARDELEANU, GH. CALALB, C. IENISTEA, L. MESROBEANU, T. GRIGORIU, E. STĂNICA, V. DUMITRESCU, N. MITRICĂ, M. FOTINO — *Vaccinarea antidifterică în R.P.R. Cercetări asupra valorii imunizante a anatoxinei difterice Ramon, în comparaţie cu anatoxina precipitantă (APT).* St. Cercet. Inframicrobiol., Microbiol., Parazitol., 1955, *6*, 477.

111. L. MESROBEANU, C. BALDOVIN, N. MITRICĂ, A. SARAGEA, P. GRITAENCO — *Cercetări asupra purificării şi concentrării toxinei Dick.* St. Cercet. Inframicrobiol .,Microbiol., Parazitol., 1955, *6*, 523.

112. M. ILIESCU, N. MITRICĂ, L. MESROBEANU — *Cercetări experimentale asupra a două tipuri de vaccin TAB preparat cu extracte microbiene adsorbite pe suport mineral.* St. Cercet. Inframicrobiol., Microbiol., Parazitol., 1956, *7*, 159.

113. L. MESROBEANU, N. MITRICĂ, I. MESROBEANU — *Cercetări asupra respiraţiei variantelor de germeni sensibili şi rezistenţi la acţiunea antibioticelor.* St. Cercet. Inframicrobiol., Microbiol., Parazitol., 1956, *7*, 477.

114. I. MESROBEANU, L. MESROBEANU, N. MITRICĂ — *Modul de acţiune al umorilor organismului cu proprietăţi bactericide asupra respiraţiei variantelor de germeni sensibile şi rezistente la antibiotice.* St. Cercet. Inframicrobiol., Microbiol., Parazitol., 1956, *7*, 487.

115. E. PAPAZIAN, A. BADENSKI, L. MESROBEANU — *Bacteriile termofile. Cercetări asupra variabilităţii caracterelor biochimice, în funcţie de temperatura de creştere.* St. Cercet. Inframicrobiol., Microbiol., Parazitol., 1957, *8*, 95.

116. L. MESROBEANU, N. MITRICĂ, E. PAPAZIAN — *Étude du métabolisme leucocytaire au cours de la phagocytose des variantes de staphylocoques et de colibacilles. I. La respiration.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1957, *16*, 94.

117. L. MESROBEANU, N. MITRICĂ, E. PAPAZIAN — *Étude du métabolisme leucocytaire au cours de la phagocytose des variantes de staphylocoques et de colibacilles. II. La catalase.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1957, *16*, 247.

118. L. MESROBEANU, M. ILIESCU, N. MITRICĂ — *Ricerche sperimentali con due tipe de vaccino TAB precipitati con fosfato di alluminio.* Minerva Medica, 1957, *48*, 16.

119. L. MESROBEANU, E. PAPAZIAN, N. MITRICĂ — *Étude du métabolisme leucocytaire au cours de la phagocytose des variantes de staphylocoques et de colibaciles. III. Les deshydrogènases.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1957, *16*, 387.

120. I. Mesrobeanu, L. Mesrobeanu, N. Mitrică, E. Papazian — *Gli enzimi leucocitari ed il problema della soprovivenza degli stafilococentri nei leucociti dopo fagocitosi.* Minerva medica, 1957, *48*, 1375.

121. L. Mesrobeanu, C. Baldovin, F. Mihalcu, N. Mitrică — *Purification et concentration de la streptolysine O par l'acide trichloracétique.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1958, *17*, 251.

122. L. Mesrobeanu, N. Mitrică — *Folosirea suporturilor de film și hîrtie pentru microelectroforeza în gel de agar.* Medicina Internă, 1958, nr. 8, 1273.

123. L. Mesrobeanu, Gh. Teodorescu — *Variațiunea metabolismului microbian în funcție de peptona utilizată în mediul de cultură. I. Respirația variantelor S și R de typhimurium.* St. Cercet. Biochimie, 1958, *1*, 133.

124. N. Mitrică, T. Ieremia, L. Mesrobeanu — *Cercetări experimentale pe șoarece cu vaccinuri disenterice polivalente preparate cu extracte bacilare adsorbite pe suport mineral.* St. Cercet. Inframicrobiol. Microbiol. Parazitol., 1958, *9*, 97.

125. L. Mesrobeanu, C. Zilisteanu, N. Mitrică — *Studiul imunoelectroforetic al serurilor antiom.* Medicina Internă, 1959, nr. 1, 153.

126. L. Mesrobeanu, C. Zilisteanu, N. Mitrică — *L'étude immunochimique des serums antihomme.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1958, *18*, 281.

127. L. Mesrobeanu, E. Papazian, N. Mitrică — *Etude du métabolisme leucocytaire au cours de la phagocytose des variantes de staphylocoques. IV. L'activité lipasique et protéolitique du leucocyte en état de repos et en hyperfonction.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1959, *18*, 543.

128. L. Mesrobeanu, E. Păunescu — *Fiziologia bacteriană.* Ed. Acad. R.P.R., 1960, 1 vol., 648 pp.

129. L. Mesrobeanu, E. Păunescu — *Cercetări asupra penicilino-rezistenței stafilococului.* Analele Româno-Sovietice, 1960, *14*, 57, seria III,Biol.

130. L. Mesrobeanu, E. Alexenco, N. Mitrică — *Purification partielle de l'anatoxine et de la toxine staphylococcique alpha.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1960, *19*, 211.

131. E. Papazian, L. Mesrobeanu — *Recherches sur l'antigène Vi d'origine colibacillaire.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1960, *19*, 255.

132. I. Mesrobeanu , M. Georgesco, T. Ieremia, E. Papazian, E. Drăghici, L. Mesrobeanu — *Action des toxines microbiennes sur les cultures de tissus. II. Action cytotoxique des endotoxines glucido-lipidiques.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1960, *19*,345.

133. L. Mesrobeanu, Gh. Teodorescu — *Variation du métabolisme microbien en fonction de la peptone utilisée dans le milieu de culture.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1960, *19*, 355.

134. L. Mesrobeanu, A. Marx, D. Stavri, Gh. Teodorescu — *Mediile de cultură în Microbiologia medicală.* Ed. Medicală, Buc., 1961, 1, vol., 288 pp.

135. L. Mesrobeanu, I. Mesrobeanu, N. Mitrică — *Les protéines toxiques des germes gram négatifs.* V^{-e} Congr. Int. Biochimie, Moscou ,USSR, aug. 1961, 289.

136. I. Mesrobeanu, L. Mesrobeanu, D. Drăghici, E. Alamita — *L'effet cytotoxique des endotoxines „O" et des protéines toxiques des germes gram negatifs.* V^{-e} Congr. Int. Biochimie, Moscou, USSR, aug, 1961, 289.

137. L. Mesrobeanu, I. Mesrobeanu, N. Mitrică — *Les endotoxines thermolabiles (neurotoxines) des germes gram négatifs. I. Les neurotoxines du bacille typhimurium S et R.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1961, *20*, 399.

138. L. Mesrobeanu, I. Mesrobeanu, N. Mitrică — *Les endotoxines thermolabiles (neurotoxines) des germes gram négatifs. II. Les neurotoxines des bacilles dysentériques.* III^{-e} Congr. Hung. Assoc. Microbiol., Budapest, oct. 1961.

139. L. Mesrobeanu — *Fiziologie bacteriană, în Bacteriologia Medicală.* Ed. Med., 1961, 82,

140. L. Mesrobeanu, I. Mesrobeanu, N. Mitrică — *Les endotoxines thermolabiles (neurotoxines) des germes gram négatifs. II. Les neurotoxines des bacilles dysentériques.* — Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1962, *21*, 31.

141. I. Mesrobeanu, L. Mesrobeanu, M. Georgesco, D. Drăghici, E. Alamita, T. Ieremia — *Action des toxines microbiennes sur les cultures de tissus. III. Action cytotoxique des endotoxines thermolabiles (neurotoxines) des germes gram négatifs.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1962, *21*, 19.

142. I. Mesrobeanu, L. Mesrobeanu, N. Mitrică, C. Racoviță — *Neurotoxinele germenilor gram negativi izolați din infecții urinare.* Al III-lea Congr. Int. Patol. Infect., Buc., oct. 1962, 130.

143. D. Stavri, L. Mesrobeanu — *Les endotoxines thermolabiles (neurotoxinse) des germes gram négatifs. III. Action des neurotoxines de typhimurium „S" et „R" sur les leucocytes polynucléaires du cobayes.* Arch. roum. Path. Exp. Microbiol., 1962, *21*, 545.

144. St. Antohi, D. Stavri, L. Mesrobeanu — *Les endotoxines thermolabiles (neurotoxines) des germes gram-négatifs. IV. Influence des endotoxines thermolabiles du S. typhimurium sur la migration éléctrophorétique des leucocytes et sur la diapédèse leucocytaire.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1962, *21*, 553.

145. L. Mesrobeanu, I. Mesrobeanu, N. Mitrică — *Les neurotoxines de colibacilles.* C.R. Acad. Sci., Paris, 1962, *255*, 1423.

146. L. Mesrobeanu, N. Mitrică, I. Mesrobeanu — *Les endotoxines thermolabiles (neurotoxines) des germes gram négatifs. V. Les neurotoxines du colibacille.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1962, *21*, 703.

147. I. Mesrobeanu, L. Mesrobeanu, N. Mitrică, C. Racoviță, E. Tomas — *Les endotoxines thermolabiles (neurotoxines) des germes gram négatifs. VI. Les neurotoxines des germes Gram négatifs (coli, proteus pyocyaneus) isolés d'infections urinaires.* — Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1963, *22*, 349.

148. L. Mesrobeanu, I. Mesrobeanu, N. Mitrică, I. Croitoresco, A. Marx — *Stade actuel des recherches sur les neurotoxines des germes gram-négatifs.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1963, 22, *775*.

149. C. Bona, L. Mesrobeanu — *Certains aspects concernant la cytochimie de la phygocytose.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1963, *22*, 1031.

150. L. Mesrobeanu, I. Mesrobeanu, C. Bona — *Les neurotoxines des germes gram négatifs et leur action sur les animaux de laboratoire.* — II^{-nd} Int. Pharmacol. Meeting, Prague, Czechoslovakie, aug. 1963.

151. L. Mesrobeanu, I. Mesrobeanu, N. Mitrică, C. Racoviță, E. Tomas, D. Dimitriu — *Soluble neurotoxins in urine infected by gram-negative organisms.* Lancet, 1963, no. 7316, 1067.

152. L. Mesrobeanu, E. Păunescu — *Fiziologia bacteriană* (în limba rusă), Ed. II, revăzută și completată, Ed. Acad. R.P.R., 1963, 1 vol., 807 pp.

153. I. Mesrobeanu, L. Mesrobeanu, C. Bona — *Modification cytoenzymologiques au cours de la phagocytose. I. Etude sur les dehydrogènases du cycle de Krebs dans l'exudat leucocytaire péritonéal de cobaye au cours de la phagocytose du Corynebacterium hoffmani et de Salmonella typhimurium variantes S et R.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1964, *23*, 191.

154. I. Mesrobeanu, L. Mesrobeanu, I. Croitorescu, N. Mitrică — *L'activité bactériocinique des neurotoxines des germes gram négatfis.* C.R. Ac. Sci., Paris, 1964, *258*, 1919.

155. L. Mesrobeanu, I. Mesrobeanu, N. Mitrică, C. Racoviță, E. Tomas, D. Dimitriu — *Les endotoxines thermolabiles (neurotoxines) des germes gram négatifs. VII. Neurotoxines solubles dans l'urine des sujets infectés avec des germes gram négatifs.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1964, *23*, 229.

156. A. Marx, L. Mesrobeanu — *Contribution à l'étude de la constitution en acides aminés des neurotoxines de S. typhimurium.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1964, *23*, 555.

157. I. Mesrobeanu, L. Mesrobeanu, E. Alamita, D. Drăghici, E. Grigorasco, M. Georgesco — *Action des toxines microbiennes sur les cultures de tissus. IV. Action cytotoxiques des endotoxines thermolabiles (neurotoxines) solubles dans l'urine des malades inffectés avec des germes gram négatifs.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1964, *23*, 581.

158. I. Mesrobeanu, C. Bona, L. Mesrobeanu — *La pinocytose par le leucocytes de l'endotoxine „O" de Salmonella typhimurium „S". I. Observations concernant la pynocitose des endotoxines au moyen de la microscopie avec contraste de phase et fluorescente, aussi qu-avec des tests cytochimiques.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1964, *23*, 615.

159. I. Mesrobeanu, C. Bona, R. Voiculescu, L. Mesrobeanu — *La pinocytose par les leucocytes de l'endotoxine „O" de Salmonella typhimurium „S". II. Observations sur la pynocytose de l'endotoxine en microscopie élctroniques.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1964, *23*, 627.

160. I. Mesrobeanu, C. Bona, L. Mesrobeanu — *Pinocytosis by leucocytes of „O" endotoxins.* Exp. Cell. Res., 1964, *36*, 434.

161. L. Mesrobeanu, I. Mesrobeanu, C. Bona — *La pinocytose de neurotoxines par les leucocytes.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1965, *24*, 301.

162. N. Mitrică, P. Pleceas, L. Mesrobeanu — *Crystallization of the Dick toxin.* Zeit. Imunitäts. Allergieforsch., 1965, *129*, 78.

163. I. Mesrobeanu, L. Mesrobeanu, C. Bona — *Modifications cytochimiques au cours de la phagocytose. I. Etude cytochimique des acides nucléiques et de protéines des leuco-*

cytes de l'exudat péritoneal de cobaye infecté avec Staphylococcus aureus et Staphylococcus citrin. Folia Haematologica, 1965, *82*, 382.

164. L. Mesrobeanu, I. Mesrobeanu, C. Bona, M. Mateescu — *Modifications cytochimiques au cours de la phagocytose. II. Etudes sur la variation des glucides et de lipides au cours de la phagocytose du Staphylocoque doré et citrin.* Folia Hematologica, 1965, *84*, 158.
165. I. Mesrobeanu, L. Mesrobeanu, M. Croitorescu, N. Mitrică — *Activitatea bacteriocinică a neurotoxinelor germenilor gram-negativi.* — Rev. Medico-Chirurgicală, Iaşi, 1965, *69*, 93.
166. L. Mesrobeanu, I. Mesrobeanu, M. Croitoresco, N. Mitrică — *L'activité bactériocinique des neurotoxines des germes qram-négatifs.* — Zentr. Bakt. Parasitenk. Inf. Hyg., 1 orig. A, 1965, *196*, 295.
167. E. Păunescu, L. Mesrobeanu — *Capacitatea vaccinului ECG şi a unor componente bacilare de a hipersensibiliza animalul de experienţă la acţiunea endotoxinelor enterobacteriaceelor.* Probleme de Tuberculoză, 1964, *5*, 111.
168. I. Mesrobeanu, L. Mesrobeanu — *Toxinele germenilor gram-negativi.* Microbiol. Parazitol. Epidemiol., 1965, no. 5—6, 461.
169. I. Mesrobeanu, C. Bona, L. Ioanid, L. Mesrobeanu — *Pinocitoza exotoxinelor germenilor gram-pozitivi de către leucocite.* I. Congr. Nat. Microbiol. Med., Bucureşti, sept. 1965, 73.
170. L. Mesrobeanu, I. Mesrobeanu, C. Racoviţă — *Activitatea bacteriocinică a neurotoxinelor solubile izolate din urina infectată cu bacterii gram-negative.* I Congr. Nat. Microbiol., Med., Bucureşti, sept. 1965, 73.
171. N. Mitrică, F. Mihalcu, L. Mesrobeanu — *Metoda de concentrare şi purificare a streptokinazei.* I. Congr. Nat. Microbiol. med., Bucureşti, sept. 1965, 74.
172. N. Mitrică, P. Pleceas, A. Marx, L. Mesrobeanu — *Cercetări chimice şi imunochimice asupra toxinei Dick cristalizate.* I. Congr. Nat. Microbiol. Med., Bucureşti, sept. 1965, 74.
173. E. Păunescu, L. Mesrobeanu — *Hipersensibilizarea şoarecilor şi cobailor faţă de neurotoxina de Salmonella typhimurium sub acţiunea bacilului tuberculozei şi a unora din componentele sale.* I. Congr. Nat. Microbiol. med., Bucureşti, sept. 1965, 75.
174. N. Pozsgi, V. Andreescu, I. Caffe. C. David, L. Mesrobeanu, N. Mitrică — *Cercetări privind sensibilizarea şoarecilor vaccinaţi antipertussis faţă de neurotoxină.* Congr. Nat. Microbiol. Med., Bucureşti, sept. 1965, 78.
175. I. Mesrobeanu, L. Mesrobeanu, N. Mitrică, A. Retezeanu, D. Ciobanu, S. Retezeanu — *Neurotoxinele solubile în urina bolnavilor cu tulburări psihice şi infectaţi cu colibacili.* Vol. Omagial Mihai Ciucă, Ed. Acad., 1965, 279.
176. N. Pozsgi, V. Andreesco, I. Caffe, C. David, L. Mesrobeanu, N. Mitrică — *Recherches concernant la sensibilisation à la neurotoxine des souris vaccinées antipertussis.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1965, *24*, 687.
177. L. Mesrobeanu, I. Mesrobeanu, C. Bona, L. Ioanid — *Pinocytosis of some exotoxins by leucocytes. Pinocytosis of Diphteria toxin and Dick erytrotoxin.* Exp. Cell. Res., 1966, *42*, 490.
178. L. Mesrobeanu, I. Mesrobeanu, N. Mitrică — *The neurotoxins of gram negative bacteria: The thermolabile endotoxin.* — în „Molecular Biology of Gram-negative Bacterial Lipopolysaccharides", Ann. N.Y. Acad. Sci., 1966, *133*, 685.
179. L. Mesrobeanu, I. Mesrobeanu, M. Croitoresco, C. Racoviţă, C. Georgesco — *Le pouvoir bactéricide des endotoxines thermolabiles (neurotoxines) solubles dans les urines infectées avec des germes gram négatifs.* IX-th Int. Congr. Microbiol., Moscow, USSR, 1966, 219.
180. I. Mesrobeanu, C. Bona, L. Mesrobeanu — *L'étude cytoenzymologique de certains hydrolases leucocytaires au cours de la phagocytose du staphylocoque doré et citrin.* IX-th Int. Congr. Microbiol., Moscow, USSR, 1966, 403.
181. I. Mesrobeanu, C. Bona, L. Mesrobeanu — *L'étude cytoenzymologique de quelques hydrolases leucocytaires au cours de la phagocytose du staphylocoque doré et citrin.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1966, *25*, 253.
182. L. Mesrobeanu, I. Mesrobeanu — *Toxinele germenilor gram pozitivi.* Microbiol. Parazitol. Epidemiol., 1966, *11*, 193.
183. L. Mesrobeanu, N. Mitrică, F. Mihalcu — *Cristallisation de la streptokinase; activateur du système protéolytique.* Rev. Roum. Biochimie, 1966, *3*, 301.
184. L. Mesrobeanu, I. Mesrobeanu, N. Mitrică, M. Croitoresco, C. Racoviţă — *Les endotoxines thermolabiles solubles dans les urines des malades ayant des infections urinaires dues aux germes gram négatifs.* Med. Hyg., 1967, no. 768, 194.

185. I. MESROBEANU, M. GEORGESCO, L. MESROBEANU — *Considérations concernant l'action des toxines des germes gram négatifs sur les cultures de cellules.* Ann. Immunol. Hung., 1966, *9*, 133.

186. I. MESROBEANU, L. MESROBEANU, C. BONA — *Pinocytose des toxines par les leucocytes provenant des animaux immunisés.* Med. Hyg., 1967, no. 768, 197.

187. I. MESROBEANU, C. BONA, D. VRANIALICI, L. IOANID, L. MESROBEANU — *Pinocytosis of Salmonella typhimurium „O" endotoxin by leucocytes of immunised animals.* Zeit. Immunitätsforsch. Allergie Klin. Immunol., 1967, *133*, 108.

188. N. MITRICĂ, P. PLECEAS, A. MARX, D. MOVILEANU, L. MESROBEANU — *Recherches chimiques et immunochimiques sur la toxine Dick cristallisée.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1967, *26*, 327.

189. L. MESROBEANU, N. MITRICĂ, F. MIHALCU, D. MOVILEANU — *Biochemical properties of a crystallized streptokinase.* Zeit. Immunitätsforsch. Allergie Klin. Immunol., 1968, *136*, 187.

190. L. MESROBEANU, E. PĂUNESCU — *Antigenele*, în *Imunologie și imunopatologie*, I. Mesrobeanu, St. Berceanu, Ed. Medicală, București, 1968.

191. I. MESROBEANU, D. VRANIALICI, C. BONA, L. MESROBEANU — *Competition entre les processus de phagocytose et de pinocytose au cours de la captation des antigènes.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1968, *27*, 433.

192. L. MESROBEANU, I. MESROBEANU, C. BONA, D. VRANIALICI — *La structure et les effets biologiques des produits bactérienes provenant des germes gram négatifs. Le destin des endotoxines thermostables pinocytées par les leucocytes.* Coll. Int. Centre Nat. Rech. Sc., 1967, no. 174, 429.

193. N. MITRICĂ, P. PLECEAS, L. MESROBEANU — *Noi medii pentru creșterea și izolarea streptococilor, pneumococilor, enterococilor. I. Mediul de creștere preparat în Inst., Dr. I. Cantacuzino.* Microbiol. Parazitol. Epidemiol 1969, no. 5, 469.

194. P. PLECEAS, N. MITRICĂ, L. MESROBEANU, C. BOGDAN — *Noi medii pentru creșterea și izolarea streptococilor, pneumococilor și enterococilor. II. Medii selective: Mediul SSP și mediul SE.* Microbiol. Parazitol. Epidemiol., 1969, no. 5, 473.

195. I. MESROBEANU, L. MESROBEANU, C. BONA, D. VRANIALICI, AL. PETROVICI — *Immunogenicity of lysosomal fractions prepared from leucocytes which pinocytized endotoxin.* Zeit. Immunitätsforsch, 1970, *139*, 301.

196. I. MESROBEANU, L. MESROBEANU — *Uptake of bacterial protein toxins by cells.* în *Microbial Toxins*, Academic Press, vol. 1 *Bacterial Protein Toxins*, 1970, 445.

197. L. MESROBEANU, N. MITRICĂ, P. PLECEAS, C. BOGDAN, C. GEORGESCU — *Milieux de cultures et d'isolement pour les streptocoques, pneumocoques et enterococques.* — Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1970, *29*, 67.

198. N. MITRICĂ, F. MIHALCU, L. MESROBEANU, C. GEORGESCU — *Recherches sur la purification de la streptolysine O.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1970, *29*, 205.

199. R. ROBINEAUX, L. MESROBEANU, C. BONA, A. ANTEUNIS, VL. GHEORDUNESCU — *Rôle biologique de l'ARN-immunogène macrophagique.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1970, *29*, 659.

200. D. BUTUR, D. MOVILEANU, L. MESROBEANU — *Cercetări privind izolarea și purificarea proteinei C reactive din exudatele pleurale.* Consfătuirea de Biochimie, București, dec. 1970.

201. L. MESROBEANU, I. MESROBEANU — *Salmonella typhimurium and Escherichia coli neurotoxins.* în *Microbial Toxins*, Academic Press, vol. II-A *Bacterial Protein Toxins*, 1971, 301.

202. D. BUTUR, D. MOVILEANU, L. MESROBEANU — *Cercetări imunochimice și biologice cu neurotoxina Typhimurium S extrasă prin metoda Yoshida.* Al II-lea Congr. Nat. Microbiol., Med., București, sept. 1971.

203. A. SĂVULESCU, L. MESROBEANU, M. POPESCU, D. MOVILEANU — *Induction de tumeurs par l'endotoxine thermostable d'Agrobacterium tumefaciens sur Datura Stramonium.* Ann. Inst. Pasteur, 1971, *121*, 405.

204. L. MESROBEANU, A. POPESCU, D. MOVILEANU — *Tumor-inducing action of thermolabile endotoxin from Agrobacterium tumefaciens on Datura stramonium plants.* Rev. Roum. Biol. — Botanique, 1971, *16*, 445.

205. J. SOUREK, M. DIGEON, L. MESROBEANU, M. RAYNAUD — *Etudes des endotoxines lourdes et de la neurotoxine de Shigella dysenteriae (Shiga) formes „smooth" et „rough" i séparation et purification.* Ann. Microbiol., Inst. Pasteur, 1973, *124 A*, 45.

206. A. AUGUSTIN, VL. GHEORDUNESCU, J. BRUCHER, L. MESROBEANU — *Etude d'un modèle esperimental de contact intercellulaire. I. Utilisation de la phytohemagglutinine comme agent blastogène.* Arch. Roum. Path-Exp. Microbiol., 1973, *32*, 237.

207. L. Mesrobeanu, D. Butur, D. Movileanu — *Toxines microbiennes et contact intercellulaire in vitro. Rôle des endotoxines microbiennes thermostables et thermolabiles de Salmonella typhimurium S.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1973, *32*, 245.

208. D. Niculescu, D. Butur, L. Mesrobeanu — *Rélations immunochimiques entre la protéine de l'endotoxine et la fraction bactéricide de la neurotoxine.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1973, *32*, 380.

209. L. Mesrobeanu, D. Butur, D. Niculescu — *Action cytotoxique du lymphocyte et mécanismes impliqués dans le contact intercellulaire. II. Rôle des endotoxines dans le contact intercellulaire.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1973, 32, 387.

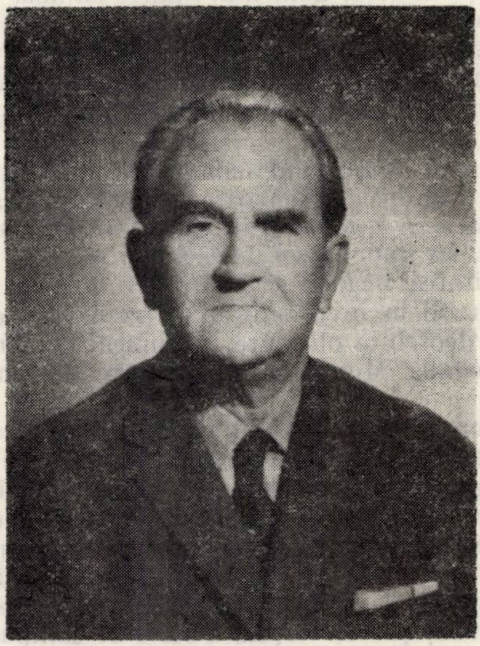
210. M. Teodorescu, D. Butur, Al. Gaspar, Niculescu D., I. Mesrobeanu — *Action cytotoxique du lymphocyte et mécanismes impliqués dans le contact intercellulaire. IV. Obtention du matériel macromoléculaire libéré parles cellules lymphoides de cobaye maintenus en culture.* Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1973, *32*, 391.

211. L. Mesrobeanu, D. Movileanu, D. Butur — *Immunologic relationship between the bactericidal fraction of the neurotoxin and the protein extracted from the endotoxin of Salmonella typhimurizm S.* Int. Symp. „Toxic Products of Bacteria", Praga, Czehoslovakia, sept. 1973.

212. L. Mesrobeanu, D. Movileanu, D. Butur — *Immunologic relationship between the bactericidal fraction of neurotoxin and the protein from Salmonella typhimurium S endotoxin.* J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol., 1974, *18*, 411.

213. L. Mesrobeanu, E. Păunescu — *Determinanți antigenici. Caracterele substanțelor antigenice.* în *Immunologie, imunochimie, imunopatologie,* I. Mesrobeanu, St. Berceanu, Ed. Acad. RSR, 1975, 59.

NECROLOG



DR. TRAIAN RĂDULESCU

(1906–1978)

În ziua de 5 ianuarie 1978, s-a stins din viaţă doctorul Traian Rădulescu, unul dintre biochimiştii români cunoscuţi, fost şef de secţie la Institutul de biochimie şi membru în comitetul de redacţie a primelor două reviste de biochimie din ţară „Studii şi cercetări de biochimie" şi „Revue roumaine de biochimie".

S-a născut la 22 mai 1906, în Ploieşti, ca ultimul din cei 12 fraţi. După ce termină 6 clase ale şcolii primare din oraşul său natal, urmează ca elev strălucit liceul din Tîrgu Mureş, iar apoi din anul 1928 Facultatea de Chimie din Cluj. După terminarea facultăţii pleacă pentru completarea

St. cerc. biochim., 22, 2, 117–119 (1979)

cunoștințelor sale de specialitate timp de 1 an la Strassbourg la Școala superioară pentru studiul petrolului, iar apoi, — după ce a lucrat 1 an la Rafinăria Teleajen — tot pe timp de 1 an la Catedra de chimie organică a Universității din Nancy.

Întors în țară, lucrează din 1934 ca chimist în Laboratorul de control al Capitalei, înființat de profesorul dr. C. Istrati pentru analize alimentare, biologice și de altă natură, unde, după scurtă vreme ajunge chimist șef. Lucrează în acest laborator municipal pînă în 1949 cînd, în urma reorganizării activității în acest domeniu, ajunge chimist șef al Laboratorului de igienă al sectorului 1 Mai.

Între anii 1945 —1950 își efectuează teza de doctorat sub conducerea acad. E. Macovschi, perioadă în care cumulează și funcția de asistent, iar apoi cea de șef de lucrări la Facultatea de științe a Universității București.

Începînd cu anul 1952, anul inaugurării Institutului de biochimie și pînă în 1977, un an după pensionarea sa, doctorul Traian Rădulescu își desfășoară activitatea sa neobosită în cadrul acestui institut, la început ca șef de laborator, iar apoi ca șef de secție și secretar științific.

Pentru activitatea bogată și multilaterală desfășurată ca chimist analist, cadru didactic în învățămîntul superior și cercetător științific și pentru meritele deosebite obținute în muncă, dr. Traian Rădulescu a fost decorat cu Medalia Muncii și cu Medalia „25 ani de la eliberarea patriei".

În viața de familie a fost un soț și un părinte ideal.

În activitatea sa a abordat variate și interesante probleme din domeniul chimiei organice și a biochimiei. Aduce contribuții valoroase în caracterizarea unor nitro-amide aromatice derivate de la stilben și în obținerea unor noi derivați ai oxi- și aminostilbenilor, care au format obiectul tezei sale de doctorat. Tot în domeniul chimiei organice se încadrează și preocupările legate de obținerea unor substanțe curarizante de sinteză. Astfel, reușește să obțină o serie de compuși noi, derivați de la fluoren, stilben și antrachinonă, care, datorită fluorescenței sau a culorii lor intensive au putut fi folosite ca substanțe trasoare în studiul mecanismului de acțiune a relaxanților musculari și a relațiilor existente între structura chimică și activitatea biologică.

În domeniul biochimiei s-a preocupat mai ales de probleme legate de excitabilitatea sistemului neuro-muscular, aducînd, între altele, contribuții originale cu privire la efectele denervării, narcozei și curarizării asupra mușchiului striat. Demne de amintit sînt și rezultatele obținute la studiul unor aspecte ale metabolismului fosforic la germenii grîului de toamnă în cursul iarovizării, o problemă de mare actualitate la un moment dat.

Dr. Traian Rădulescu va rămîne în amintirea celor care l-au cunoscut ca un om cu totul deosebit, cu o fire modestă, de o delicatețe rară și o discreție desăvîrșită, întotdeauna gata să ajute și să încurajeze cu mult tact și competență pe colegii săi. Chiar și răpus deja de cumplita boală, fără șanse de vindecare, a rămas același om lucid, subtil, atașat familiei și colegilor din institut, suportînd discret, fără să supere pe cei din jur, cu o tărie nemaipomenită greaua suferință ce i-a fost dat s-o ducă la capăt.

BIBLIOGRAFIA SELECTIVĂ A LUCRĂRILOR DE BIOCHIMIE ŞI CHIMIE ORGANICĂ ÎN ORDINEA CRONOLOGICĂ

1. *Reducerea unor meta-nitro-amide aromatice cu ajutorul pulberei de zinc*, Bul. şt. Acad. R.P.R., *1*, 253 (1949), în colaborare cu E. Macovschi.
2. *Unele comportări chimice ale nitro-amido-stilbenilor*, Com. Acad. R.P.R., *1*, 355 (1951), în colaborare cu E. Macovschi.
3. *Sinteze în domeniul oxi- şi aminostilbenilor substituiţi*, Bul. Acad. R.P.R., secţia St. Biol. Agr. Geol. Geogr., *4*, 489 (1952).
4. *Unele săruri de amoniu cuaternar derivate de la 2-amino-fluoren şi 2,7-diaminofluoren*, Com. Acad. R.P.R., *8*, 793 (1958); Rev. Chim., Acad. R.P.R., *3*, 261 (1958), în colaborare cu S. S. Vasu.
5. *Unele aspecte ale metabolismului fosforic la germenii grîului de toamnă A_{15} în cursul iarovizării. Variaţia fosforului nucleic şi mineral*, St. cerc. biochim., *2*, 67 (1959), în colaborare cu H. D. Schell.
6. *Substanţe curarizante de sinteză. Unele relaţii dintre structura şi activitatea lor*, St. cerc. biochim., *3*, 361 (1960).
7. *Exosmoza fosforului anorganic ca test al stării muşchiului*, St. cerc. biochim., *5*, 485 (1962), în colaborare cu E. Macovschi, L. Scolnic.
8. *Exosmoza fosfatului anorganic din muşchi în narcoză şi mişcare pasivă*, St. crec. biochim., *7*, 243 (1964); Rev. roum. biochim., *1*, 197 (1964), în colaborare cu D. Cotariu.
9. *Fosforul anorganic şi exosmoza lui din muşchi în diferite stări de excitabilitate şi efort*, St. cerc. biochim., *7*, 97 (1964); Rev. roum. biochim., *1*, 89 (1964), în colaborare cu D. Cotariu şi L. Scolnic.
10. *Exosmoza fosfatului anorganic în diferite stări funcţionale ale muşchiului*, St. cerc. biochim., *7*, 237 (1964); Rev. roum. biochim., *1*, 191 (1964), în colaborare cu L. Scolnic.
11. *Acţiunea narcozei asupra nivelului fosfocreatinei din muşchi*, St. cerc. biochim., *8*, 77 (1965); Rev. roum. biochim., *2*, 63 (1965), în colaborare cu D. Cotariu.
12. *The effect of denervation, narcosis and curarization on cation movements in striated muscles*, Rev. roum. biochim., *2*, 343 (1965), în colaborare cu D. Cotariu.
13. *Deplasarea potasiului şi sodiului din muşchiul striat de broască în contracţie liberă şi contracţie cu travaliu mecanic*, St. cerc. bicohim., *9*, 277 (1966), în colaborare cu D. Cotariu.
14. *Distribuţia sodiului între compartimentele intracelular şi extracelular ale muşchiului gastrocnemian de broască denervat*, St. cerc. biochim., *10*, 111 (1967), în colaborare cu D. Cotariu.
15. *Quäternäre Ammoniumsalze des Acetamido-benzal-fluorens*, Rev. roum. chim., *15*, 1127 (1970), în colaborare cu H. D. Schell.
16. *Mono- und diquaternäre Ammoniumsalze des Benzal-fluorens*, Rev. roum. Chim., *15*, 1427 (1970), în colaborare cu H. D. Schell.
17. *Effect of potassium and calcium ions on the glycolysis occuring in the frog gastrocnemius*, Rev. roum. biochim., *8*, 343 (1971), în colaborare cu D. Tănăsescu, Tr. Benţia.
18. *Cercetări de biochimie musculară*, St. cerc. biochim., *15*, 347 (1972), în colaborare cu D. Tănăsescu, N. Moldoveanu, C. Medeşan, L. Scolnic, Tr. Benţia.
19. *Sinteza diiodurii şi a diclorurii de 1,4-bis-(p-trimetil-amoniu-fenil-amino)-antrachinonă*, Rev. Chim., *24*, 416 (1973), în colaborare cu H. D. Schell, L. Scolnic.
20. *Efectul anesteziei asupra concentraţiei sodiului şi potasiului din muşchiul gastrocnemian de broască*, St. cerc. biochim., *19*, 95 (1976), în colaborare cu Tr. Benţia.

Horst D. Schell
Institutul de ştiinţe biologice Bucureşti
Laboratorul de enzimologie şi biostimulatori

DIFERENŢIEREA ELECTROFORETICĂ A MUCOPOLIZAHARIDELOR DIN URINĂ

MARIA ANDRAŞ, VICTORIA DOBRE

Rezumat. Se prezintă o metodă de diferenţiere calitativă a mucopolizaharidelor din urină, prin electroforeză în gel de agaroză, în tampon 1,2-diaminoetan pH 8,5, fixare cu Cetavlon şi colorare cu albastru de toluidină. Prin utilizarea unor standarde adecvate, metoda poate fi folosită ca test de laborator în stabilirea diagnosticului diferenţial al mucopolizaharidozelor.

În cadrul bolilor genetice lizozomale (boli de acumulare) sînt cuprinse gangliozidozele şi mucopolizaharidozele, ca boli cu aspecte clinice comune (1), deşi mecanismele biochimice care le produc sînt diferite. În timp ce în gangliozidoze mucopolizaharidele se acumulează numai în ţesuturi, în mucopolizaharidoze ele se elimină în cantităţi mari şi în urină. Şi anume, fiecărui tip de mucopolizaharidoză îi este caracteristic excesul în urină a unui anumit mucopolizaharid, în funcţie de enzima deficitară implicată. De aceea, în stabilirea diagnosticului diferenţial al acestor boli sînt foarte importante testele de laborator, printre care şi examenul urinei (2) (3).

Identificarea mucopolizaharidelor urinare ajută în continuare la diferenţierea tipurilor de mucopolizaharidoze, şi de aceea s-au propus, în acest scop, numeroase metode cromatografice (4)(5) (6) şi electroforetice (7) (8) (9).

Noi ne-am oprit asupra metodei electroforetice propusă de Dietrich (10) (11) (12), deoarece prin modificările aduse şi prin folosirea unor standarde adecvate, s-au obţinut rezultate reproductibile şi eficiente în stabilirea diagnosticului diferenţial al mucopolizaharidozelor.

MATERIAL ŞI METODE

Mucopolizaharidele folosite ca standarde, şi anume: condroitin-6-sulfat (C—6—S) dermatan-sulfat (D-S) şi acidul hialuronic (A—H), au fost izolate din cordoane ombilicale umane (13) (14) şi purificate prin precipitări repetate cu alcool etilic. Heparan-sulfatul (H—S) şi Asclerolul(heparanoid duodenal) au fost procurate de la Biofarm.

Prelucrarea urinei (15). Urina colectată 24 ore de la un copil cu sindrom Hunter, s-a diluat 1/1 cu apă distilată. 30 ml urină diluată s-au adus la pH 5,0 cu acid clorhidric 1 N şi s-au precipitat cu 2 ml soluţie apoasă 2,5 % Cetavlon, încet şi sub agitare, lăsîndu-se în repaus 48 ore, la 4°C. S-a centrifugat 20 min la 5 000 r.p.m. şi precipitatul obţinut s-a reluat în 50 ml alcool etilic 95 %, saturat cu NaCl. După 20 min s-a recentrifugat şi precipitatul s-a reluat într-un volum minim de apă distilată. Soluţia astfel obţinută s-a folosit ca probă în studiile electroforetice.

Electroforeza mucopolizaharidelor. Evidenţierea calitativă a mucopolizaharidelor urinare s-a realizat printr-o metodă electroforetică modificată, prin coroborarea metodelor existente (10) (11) (12).

Electroforeza s-a realizat pe plăci de agaroză 1% în tampon etilendiaminoacetat 0,1 M, pH 8,5 (6,2 ml de 1,2-diaminoetan adus la pH 8,5 cu acid acetic glacial şi la volumul final de 1 000 ml). S-au aplicat probe de mucopolizaharide 2 mg/ml, diluate 1/1 cu agaroză.

Migrarea a durat 6 ore la un potenţial 150 V şi 1,5 mA/cm/placă. După migrare, plăcile au fost introduse într-o soluţie apoasă 0,1% Cetavlon, timp de 2 ore pentru fixarea mucopolizaharidelor precipitate; spoturile de mucopolizaharide precipitate vor apărea ca pete albicioase. După uscare, plăcile s-au colorat într-o soluţie 1% albastru de toluidină dizolvat într-un amestec de acid acetic : alcool etilic: apă (0,1 : 5 : 5) v/v (11), timp de 2 ore.

Decolorarea s-a făcut prin spălări repetate în soluţie de acid acetic 1%, plăcile lăsîndu-se în ultima baie de spălare timp de 24 ore. După decolorare apar spoturile de mucopolizaharide intens colorate în albastru-violet.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În urina normală se elimină pe zi 3,8 mg mucopolizaharide la femei şi 6 mg la bărbaţi (16). Dintre acestea cea mai mare parte sînt C—4—Si, C—6—S şi produşii lor de degradare, în timp ce D—S, K—S (Keratan-sulfat), H—S şi A—H reprezintă împreună mai puţin de 10% din cantitatea totală eliminată (17).

În urina pacienţilor cu mucopolizaharidoze sînt prezente H—S, D—S, K—S şi principalii lor produşi de degradare dependent de tipul enzimei deficitare. Cu toate că C—4—S, C—6—S şi A—H nu au fost considerate a fi implicate drept constituenţi majori în nici un tip de mucopolizaharidoze, recent au fost prezentate cazuri avînd condroitin sulfaţii drept principali polizaharizi eliminaţi în urină, (18) (19).

Proba de urină luată în studiu şi supusă electroforezei s-a separat în două componente : I — cu viteză de migrare mai mare şi a II-a — cu viteză de migrare mai mică (fig. 1, 2 şi 3).

C—6—S a fost sub limita de decelare a metodei (fig. 1). Heparina şi Asclerolul au migrat cu viteze intermediare fracţiunilor probei de urină, iar acidul hialuronic cu o viteză mult mai mare decît fracţiunea I a probei (fig. 2 *b* şi 3).

Fracţiunea I a probei de urină a fost identificată a fi dermatan-sulfatul (fig. 1, 2 *a* şi 2 *c*).

Pentru identificarea fracţiunii a II-a a probei de urină, în lipsa unor standarde de mucopolizaharide, am recurs la alte metodologii mai laborioase, ca determinarea hexozaminelor (20) (21) şi a sulfatului aminic (22). Am obţinut prin aceste metode un conţinut crescut de glucozamină a probei şi mai ales de sulfat aminic, component specific heparan-sulfatului. Am considerat astfel că fracţiunea a II-a a probei de urină corespunde heparan-sulfatului, pacientul investigat suferind, conform diagnosticului clinic, de sindrom Hunter (1). De fapt, în toate cazurile se face necesară coroborarea datelor clinice cu cele biochimice.

Modificările aduse de noi metodei originale, prin care am obţinut rezultate bune, sînt : concentraţia colorantului albastru de toluidină de 1% faţă de 0,1% din metoda originală; timpul de colorare de 2 ore faţă de 15 min şi, lăsarea plăcilor avansat decolorate în ultima baie de acid acetic 1% timp de 24 ore.

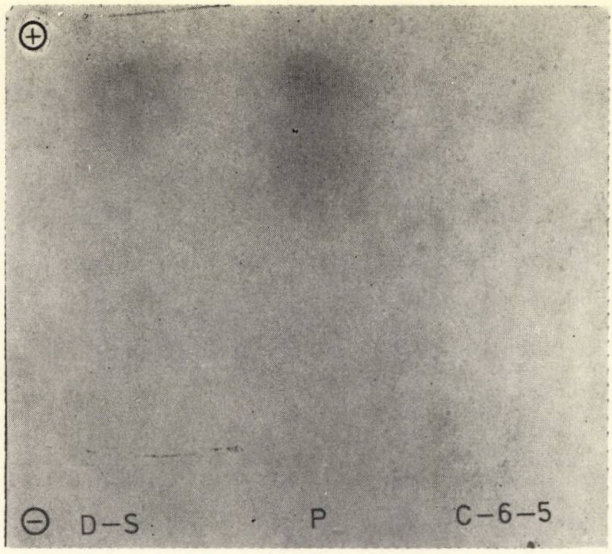
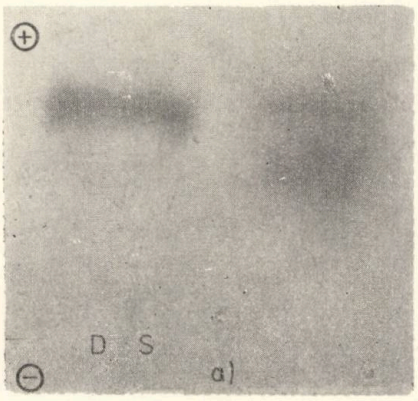
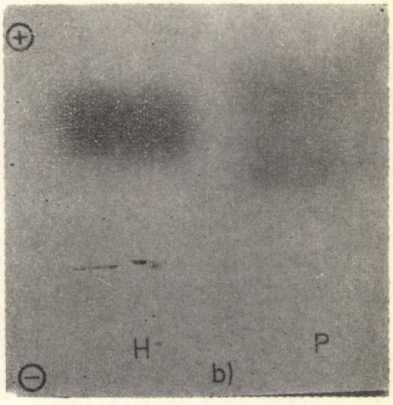


Fig. 1. — Electroforeza mucopolizaharidelor în gel de agaroză în tampon diaminic.
D-S = dermatan-sulfat; 10 mg/ml; P = proba de urină; C-6-S = condroitin-6-sulfat, 2,5 mg/ml





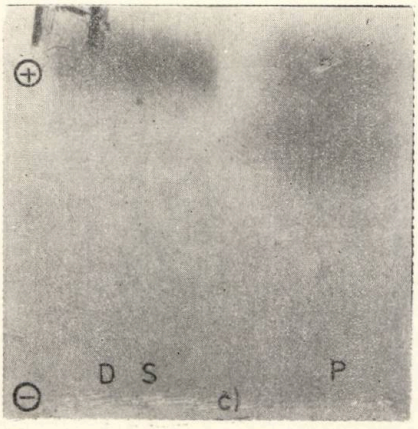


Fig. 2. — *a*, *b*, *c*. Electroforeza mucopolizaharidelor în gel de agaroză în tampon diaminic. D-S = dermatan-sulfat, 10 mg/ml; P = proba de urină; H = heparină, 25 γ/ml

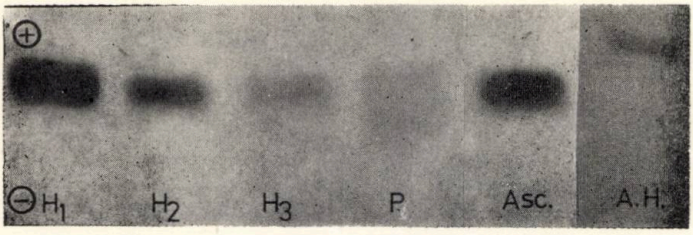


Fig. 3. — Electroforeza mucopolizaharidelor în gel de agaroză în tampon diaminic.
H_1 = Heparină, 250 γ/ml; H_2 = Heparină, 100 γ/ml; H_3 = Heparină, 50 γ/ml; P = proba de urină; Asc = Asclerol, 20 mg/ml; A.H. = acid hialuronic, 2 mg/ml.

CONCLUZII

Utilizînd standarde de mucopolizaharide adecvate, metoda prezentată pentru diferenţierea mucopolizaharidelor în urina patologică, prin gel-electroforeză în tampon diaminic, conduce la rezultate reproductibile şi poate fi utilizată drept test de laborator, în clinicile de specialitate, pentru stabilirea diagnosticului diferenţial al mucopolizaharidozelor.

Prezentată la redacţie la 11 iunie 1979

Institutul de Ştiinţe Biologice
Bucureşti
Splaiul Independenţei 296,
77748 Bucureşti 17

ELECTROPHORETIC PATTERNS OF URINE MUCOPOLYSACCHARIDES

SUMMARY

A method for electrophoretic differentiation of urine mucopolysaccharides, by electrophoresis in agarose gel, 1,2-diaminoethane buffer, pH 8.5, fixation with Cetavlon and staining with toluidine blue, is reported. This method can be used for laboratory tests of the differential diagnoses of mucopolysaccharidoses by using appropriate standards.

BIBLIOGRAFIE

1. H. G. Hers, F. van Hoof (editori), *Lysosomes and storage diseases*, Acad. Press (1973).
2. H. K. Berry, J. J. Spinanger, J. Lab. Clin. Med., **55**, 136 (1960).
3. N. Di Ferrante, B. L. Nichols, P. V. Donelly, G. Neri, R. K. Berglund, Proc. Nat. Acad. Sci., **68**, 303 (1971).
4. W. M. Teller, Nature, **213**, 1132 (1967).
5. E. Wessler, Clin. Chim. Acta, **16**, 235 (1967).
6. J. Onisawa, T. Y. Lee, Biochem. Med., **3**, 404 (1970).
7. T. A. Good, Anal. Biochem., **19**, 109 (1967).
8. A. Linker, P. Hovingh, Biochim. Biophys. Acta, **165**, 89 (1968).
9. T. P. McDonald, C. Lozzio, P. Lotkin, Clin. Pediatr., **9**, 272 (1970).
10. L. B. Jaques, R. E. Ballieux, C. P. Dietrich, L. W. Kavanagh, Can. J. Physiol. Pharmacol., **46**, 351 (1968).
11. C. P. Dietrich, S. M. C. Dietrich, Anal. Biochem., **46**, 209 (1972).
12. C. P. Dietrich, S. M. C. Dietrich, Anal. Biochem., **70**, 646 (1976).
13. M. B. Matheus, Method Enzym., **8**, 657 (1966).
14. L. A. Fronson, J. Biol. Chem., **243**, 1504 (1968).
15. N. DiFerrante, C. Rich, J. Lab. Clin.Med., **48**, 491 (1956).
16. N. DiFerrante, C. Rich, Clin. Chim. Acta, **1**, 519 (1956).
17. P. D. Varadi, A. J. Ciponelli, A. Dorfman, Biochim. Biophys. Acta, **141**, 103 (1967).
18. M. E. Phillpart, G. I. Sugarman, Lancet, **2**, 854 (1969).
19. P. F. Benson, M. F. Dean, H. Muir, Develop. Med. Child. Neurolı., **14**, 69 (1972).
20. G. A. Levry, A. McAllan, Biochem. J., **73**, 127 (1959).
21. L. A. Fronson, J. Biol. Chem., **243**, 1504 (1968).
22. Y. Inoue, K. Nagasawa, Anal. Biochem., **71**, 46 (1976).

CERCETĂRI PRIVIND INFLUENŢA POLYVINIL-PYRIDIN-N-OXIDULUI ASUPRA UNOR ENZIME MITOCONDRIALE ÎN ETAPELE PRECOCE ALE SILICOZEI EXPERIMENTALE

SMARANDA CONSTANTINESCU*), G. ROTARU*), GABRIELA FILIPESCU*), B. BARHAD**), I. LĂZĂRESCU**)

Rezumat. Se studiază experimental acţiunea citotoxică a bioxidului de siliciu, manifestată prin modificarea metabolismului energetic al macrofagelor alveolare recoltate prin spălătură bronhică la 24 ore după silicozarea animalelor prin test intratraheal. Pretratarea cu polyvinil-pyridin-N-oxid (polimer sintetic unanim acceptat în literatură ca agent citoprotector în silicoza experimentală) are ca rezultat menţinerea activităţii unor enzime mitocondriale la un nivel apropiat de cel al lotului martor-control.

Polimerii citoprotectori de tipul polyvinil-pyridin-N-oxid (PVP—NO) cu greutate moleculară mai mare de 40 000 (1) protejează macrofagele faţă de efectul citotoxic al bioxidului de siliciu, prin stabilizarea membranelor biologice celulare şi subcelulare(2—11), prevenind în mod particular activarea intracelulară a unor enzime lizozomale cu activitate litică. Aceşti polimeri s-ar acumula în fagozomi împreună cu particulele de cuarţ şi interacţionînd cu acestea ar împiedica exercitarea acţiunii lor litice asupra membranelor fagolizozomale.

Asupra implicării sistemelor enzimatice de tip oxidativ în silicoză, literatura de specialitate ne oferă însă date disparate şi deseori contradictorii. Astfel, în cercetări efectuate pe materiale de studiu diverse provenind de la variate specii de animale, James (12), Engelbrecht (13), Pavlova (14), Charbonnier (15), King (16), ş.a. raportează inhibări ale activităţii succinat-dehidrogenazei.

Pe de altă parte Kilroe-Smith şi Breyer (17) în 1959, pe omogenate de pulmoni obţinute de la cobai silicozaţi prin metoda prăfuirii, constată creşteri ale activităţii aceleiaşi enzime. Reluînd cercetările în 1963 şi 1964 autorii menţionaţi ajung la aceleaşi constatări (18, 19) confirmate şi de studiile lui Rilke şi Kessel (20) efectuate însă pe macrofage peritoneale de cobai cultivate „in vitro".

La noi în ţară cercetările efectuate de către un colectiv al Institutului de igienă şi sănătate publică din Bucureşti, în perioada 1966—1969 (21—24) pe omogenate de pulmoni obţinute de la şobolani silicozaţi prin test intratraheal au reconfirmat şi pe acest nou model experimental realitatea creşterii activităţii SDH în perioadele iniţiale ale silicozei.

În ceea ce priveşte citocromoxidaza, în timp ce Charbonnier (15), Engelbrecht (25—27), James (12) şi Kilroe-Smith (17, 18) evidenţiază scăderi ale activităţii sub acţiunea acizilor silicici, Barhad şi colab. (21—

—24) nu găsesc diferenţe semnificative faţă de valorile lotului martor-control.

Pe de altă parte, lipsa datelor de literatură consacrate studierii comportamentului enzimelor mitocondriale în condiţiile influenţării active a silicozei cu ajutorul polimerului PVP—NO a determinat acelaşi colectiv de cercetare al Institutului de igienă şi sănătate publică din Bucureşti să iniţieze în perioada 1967—1971 o serie de investigaţii cu privire la această problemă. Studiile efectuate (28—30) au evidenţiat pentru ambele enzime (SDH, cit. oxidaza), la loturile silicozate tratate cu PVP—NO, valori apropiate de cele ale animalelor martor.

Considerînd însă că datele furnizate de lucrările precendente, obţinute pe omogenate de pulmoni au o valoare mai mult orientativă, referindu-se la o populaţie celulară foarte diversă (elemente figurate ale sîngelui, epitelii, bronho-alveolare, elemente fibroblasto-fibrocitare, macrofage, endotelii vasculare etc.) ne-am propus ca în lucrarea de faţă să investigăm activitatea sistemului energetico-oxidativ aparţinînd unor celule (macrofagele), *presupuse ca fiind singurele lezate specific* de către particolele de cuarţ.

A fost studiată astfel activitatea unor enzime mitocondriale pe macrofage alveolare proaspete, recoltate prin spălătură bronhică la 24 ore după silicozarea animalelor prin test intratraheal, în paralel cu activitatea acelorași enzime, pe macrofage obţinute în condiţii identice de la animale pretratate cu PVP—NO.

MATERIAL ŞI METODE

Un număr de 48 şobolani Wistar de ambe sexe în greutate de 350±20 g, păstraţi în condiţii similare de alimentaţie şi hrană, a fost repartizat în trei loturi experimentale, după cum urmează :

A. Lot silicozat = 32 animale;

B. Lot pretratat cu PVP-NO şi apoi silicozat = 12 animale;

C. Lot martor-control = 4 animale

Silicozarea : s-a obţinut prin instilare intratraheală în doză unică a unei suspensii de pulbere (Quartz Q.12-Dörentrupp cu 98,5% SiO_2 liber, cristalin şi peste 90% particule cu dimensiuni între 1—3 microni) conţinînd 30 mg într-un ml ser fiziologic steril.

Pretratamentul : a constat în administrarea subcutanată a unor doze de 100 mg/kg corp de PVP-NO-„Bayer-V. 3504" (soluţie 1% în ser fiziologic steril) cu 48 şi 24 ore înainte de inducerea silicozei experimentale.

Deoarece în condiţii normale numărul macrofagelor alveolare este extrem de redus la şobolani, în vederea stimulării producerii lor, lotul de control a fost instilat intratraheal cu o substanţă nenocivă, „Zimosan" supus ultrasonării în concentraţie de 4 mg/mg ser fiziologic steril.

OBŢINEREA SUSPENSIEI DE MACROFAGE ALVEOLARE

Animalele au fost sacrificate prin înţepare şi formolizarea centrilor vitali bulbari la 24 ore după instilarea intratraheală a suspensiei de pulbere silicotigenă, 16 animale din lotul *A* fiind sacrificate şi după 48 ore de la silicozare.

Suspensia brută de macrofage alveolare s-a obţinut folosind indicaţiile tehnicii Myrvik (31) prin recoltarea lichidului de spălătură bronhică (repetată de 3 ori) cu cîte 5 ml ser fiziologic steril. Lichidul recoltat a fost prelucrat după cum urmează, în vederea obţinerii unei *suspensii purificate* de macrofage (eliminarea hematiilor, a particulelor libere de cuarţ şi a detritusurilor celulare) :

— centrifugare timp de 1 minut la 650 g;

— sedimentul a fost reluat în 10 ml sucroză 0,25 M tamponată cu Tris-HCl la pH 7,4 sub agitare magnetică;

— centrifugare 1 minut la 650 g;

— resuspendarea sedimentului recoltat sub agitare continuă timp de 1—5 minute într-o soluție Triton X-100 în concentrație finală de 0,08 % sub controlul microscopic al dispariției hematiilor;

— centrifugare 1 minut la 650 g;

— spălarea sedimentului prin resuspendare în 10 ml sucroză 0,3M urmată de centrifugare la 800 g timp de 5 minute, operația fiind repetată de 3 ori.

Sedimentul final purificat a conținut macrofagele alveolare care au fost utilizate pentru investigațiile bioenzimatice și control microscopic.

INVESTIGAȚIILE ENZIMATICE

S-au determinat activitățile specifice pentru următoarele enzime: succinatdehidrogenaza — prin reducerea fericianurii de potasiu la 450 nm (32);
citocromoxidaza — prin reducerea fericitocromului c la 55 nm (33).

În vederea stabilirii condițiilor critice pentru eliberarea enzimelor și aprecierea activității totale, s-a testat efectul de înghețare-dezghețare (repetat de 6 ori) precum și acțiunea unor concentrații variabile de dezoxicolat de sodiu (DOC-Na).

Conform rezultatelor obținute conținutul total enzimatic a fost apreciat ca valoarea cea mai ridicată obținută după disrupția membranelor cu DOC-Na în concentrație de 25 mg/ml.

REZULTATE

Rezultatele investigărilor efectuate sînt prezentate sintetic în tabelele 1—4.

Din analiza și compararea datelor reiese că pentru macrofagele obținute de la animalele lotului *A* (silicozat, netratat) activitatea ambelor enzime studiate a prezentat valori crescute față de cea a lotului de control după 24 ore. La 48 de ore diferențele s-au accentuat prin creșterea în continuare a acestor valori.

Tabela nr. 1

Activitatea enzimatică studiată pe macrofage alveolare obținute de la animale silicozate, sacrificate după 24 ore

Proba*)	citocromoxidaza liberă	citocromoxidaza totală	succinatdehidrogenaza totală
1	0,314	0,600	651×10^{-5}
	0,345	0,520	689×10^{-5}
2	0,230	0,500	608×10^{-5}
	0,243	0,560	560×10^{-5}
3	0,119	0,432	574×10^{-5}
	0,100	0,620	596×10^{-5}
4	0,256	0,539	576×10^{-5}
	0,296	0,599	588×10^{-5}

*) Fiecare probă reprezintă 4 animale sacrificate, de la care s-au obținut cîte 2 „pool"-uri de suspensii de macrofage
Rezultatele: micro moli substrat/min/mg proteină

Pentru citocromoxidază constatarea este valabilă atît în ceea ce privește activitatea liberă cît și activitatea totală.

Deoarece după 48 ore de la silicozare macrofagele lotului *A* au prezentat citologic severe lezări celulare, lotul *B* (silicozat, pretratat cu

Tabela 2

Activitatea enzimelor studiate pe macrofage alveolare obţinute de la animale pretratate cu PVP-NO, apoi silicozate şi sacrificate după 24 de ore

Proba*)	Citocromo-oxidaza liberă	Citocromo-oxidaza totală	Succinatdehidrogenaza totală
1	0,053	0,190	370×10^{-5}
	0,057	0,242	316×10^{-5}
2	0,177	0,216	312×10^{-5}
	0,065	0,196	228×10^{-5}
3	0,076	0,373	386×10^{-5}
	0,090	0,309	323×10^{-5}
Media	$0,086 \pm 0,008$	$0,254 \pm 0,072$	$(322 \pm 50) \times 10^{-5}$

*) Fiecare probă reprezintă 4 animale sacrificate, de la care s-au obţinut cîte 2 „pool"-uri de suspensie de macrofage. Rezultatele exprimate în micro moli substrat/min./mg proteină.

Tabela 3

Activitatea enzimatică studiată pe macrofage alveolare obţinute de la animale silicozate, sacrificate după 48 de ore

Proba*)	Citocromo-oxidaza liberă	Citocromo-oxidaza totală	Succinatdehidrogenaza totală
1	0,285	0,842	685×10^{-5}
	0,237	0,958	635×10^{-5}
2	0,135	0,705	576×10^{-5}
	0,203	0,655	644×10^{-5}
3	0,234	0,730	964×10^{-5}
	0,217	0,720	976×10^{-5}
4	0,189	0,800	590×10^{-5}
	0,172	0,756	682×10^{-5}
Media	$0,209 \pm 0,045$	$0,770 \pm 0,088$	$(719 \pm 156) \times 10^{-5}$

*) Fiecare probă reprezintă 4 animale sacrificate, de la care s-au obţinut cîte 2 „pool"-uri de suspensii de macrofage. Rezultatele exprimate în micro moli substrat/min.mg proteină.

PVP—NO) a fost sacrificat în întregime după 24 ore, renunţîndu-se la urmărirea efectelor şi după 48 ore. În aceste condiţii polimerul PVP—NO a determinat valori net mai coborîte ale activităţii ambelor enzime faţă de lotul neprotejat, apropiate şi chiar mai coborîte decît cele ale lotului *C* control).

Tabela 4

Activitatea enzimatică studiată pe macrofage alveolare obținute de la animale instilate cu zimosan și sacrificate după 24 de ore

Proba*)	Citocrom-oxidaza liberă	Citocrom-oxidaza totală	Succinatdehidrogenaza totală
1	0,099 0,189	0,314 0,286	490×10^{-5} 434×10^{-5}
Media	$0,144 \pm 0,064$	$0,300 \pm 0,019$	$(462 \pm 396)10^{-5}$

*) Fiecare probă reprezintă 4 animale sacrificate, de la care s-au obținut cîte 2 „pool"-uri de suspensii de macrofage.
Rezultatele exprimate în micro moli susbstrat/min/mg proteină.

DISCUȚII

Rezultatele noastre scot în evidență unele aspecte care demonstrează atît acțiunea nocivă a bioxidului de siliciu asupra macrofagelor, cît și influența citoprotectoare a pretratamentului cu PVP—NO.

Datele prezentate constituie un argument în favoarea presupunerii că acțiunea citotoxică a SiO_2 exercitată primar la nivelul altor structuri celulare sau subcelulare(34, 35, 6, 7, 36, 37, 38) nu este lipsită de consecințe nici asupra sistemelor respiratorii mitocondriale. Trebuie însă să subliniem că studiile consacrate pînă în prezent enzimelor mitocondriale în silicoza experimentală au suscitat numeroase controverse.

Urmărind acțiunea acidului silicic asupra culturilor de macrofage peritoneale (39, 40), țesuturilor sau omogenatelor din variate organe: ficat (3), cord de cal (15) etc., diverși autori raportează inhibări ale activității SDH, în timp ce alți autori (17—24) descriu creșteri ale activității acestei enzime în silicoză experimentală.

Rezultatele divergente se datoresc cu multă probabilitate marii eterogenități a materialelor de studiu (culturi de macrofage, țesuturi și omogenate de organe) și a metodelor prin care s-a urmărit acțiunea bioxidului de siliciu (prăfuire liberă, test intratraheal sau intraperitoneal).

Din acest punct de vedere considerăm că adoptarea în lucrarea noastră ca material de studiu a suspensiilor purificate de macrofage alveolare în locul omogenatelor de pulmoni, reprezintă o ameliorare de tehnică, furnizînd un mai bogat material direct reactiv.

În aceste condiții rezultatele noastre au confirmat creșterea activității ambelor enzime studiate, ca efect generat de fagocitarea particulelor de cuarț de către macrofage.

Pe de altă parte, aceleași rezultate au scos în evidență faptul că PVP—NO exercită efecte citoprotectoare, manifestate prin valori net mai coborîte ale activității enzimatice față de cele ale lotului neprotejat: apropiate și chiar mai scăzute decît cele ale lotului martor-control.

Efectele citoprotectoare ale PVP-NO par să fie însă mai puțin specifice decît se crede, exercitîndu-se nu numai asupra macrofagelor și nu numai în silicoză, deoarece o acțiune similară asupra metabolismului energetic a fost recent constatată de noi (38) și la hepatocite în intoxicația experimentală cu tetraclorură de carbon, precum și de către alți autori în variate alte condiții experimentale (6, 41—44).

Rezultatele cercetării de faţă ne permit să presupunem că în stadiile cele mai precoce ale silicozei şi anume în cursul fagocitării particulelor de cuarţ de către macrofage, prezenţa intracelulară a SiO_2 induce apariţia unor modificări funcţionale în lanţul transportor de electroni, în sensul stimulării reactive a proceselor energetice care la macrofagele alveolare, spre deosebire de cele peritoneale, sînt asigurate predominant prin fosforilarea oxidativă, după cum demonstrează studiile lui Yokomura (45) şi mai recent cele ale lui Portugalov (46). Această stimulare energetică se concretizează prin creşterea activităţii specifice a SDH (şi citocromoxidazei în cazul nostru), această creştere avînd pentru unii autori (39, 47—50) chiar valoarea unui test de apreciere a acţiunii citopatogene a pulberilor.

Protecţia realizată de PVP—NO este demonstrată prin menţinerea unui nivel al activităţii enzimelor menţionate, apropiat de cel al animalelor martor.

În ceea ce priveşte mecanismul acestei protecţii, PVP—NO ca şi alţi polimeri posesori ai grupării funcţionale—NO, este înglobat în fagosomi şi fiind rezistent la acţiunea enzimelor hidrolitice rămîne acolo un timp indefinit (34). Prin grupările sale—NO, polimerul formează legături stabile cu grupările silanolice—SiOH ale acidului silicic hidratat de la suprafaţa particulelor de cuarţ, împiedicîndu-le astfel să se lege la structurile de membrană (în special lisosomale), eventualitate care ar avea drept consecinţă directă activarea enzimelor, permeabilizarea membranelor şi autodigestia macrofagului.

CONCLUZII

Se poate reţine faptul că acţiunea citotoxică a bioxidului de siliciu este mult mai complexă decît cea acceptată în mod clasic, exercitîndu-se cu multă probabilitate asupra tuturor constituienţilor citoplasmatici ai macrofagelor, inclusiv mitocondriile şi că această acţiune poate fi anihilată cel puţin la animalele de experienţă prin administrarea unor doze adecvate pe polyvinil-pyridin-N-oxid.

Prezentat la redacţie
la 25 aprilie 1979

*) *Institutul „V. Babeş”, Spl. Independenţei 99—101, Bucureşti*
**) *Institutul de Igienă şi sănătate publică, str. Dr. Leonte nr. 1 Bucureşti*

INVESTIGATIONS ON THE ACTION OF POLYVINYL-PYRIDINE-N-OXIDE ON SEVERAL MITOCHONDRIAL ENZYMES IN EARLY STAGES OF EXPERIMENTAL SILICOSIS

SUMMARY

The cytotoxic action of silicium dioxide is experimentally investigated with regard to the alterations of energetical metabolism of alveolar macrophages selected through bronchic wash 24 hours after silicosis

has been induced in animals by intratracheal instillation of dust. The pretreatment with polyvinyl-pyridine-N-oxide (synthetic polymer unanimously accepted as a cytoprotective agent in the experimental silicosis) results in the maintenance of some mytochondrial enzymes activity at a value close to that of the test level.

BIBLIOGRAFIE

1. V. N. Hasirci, P. F. Holt, Int. Arch. Occup. Environm. Hlth., **38**, 177 (1977).
2. E. C. Allison, J. S. Harington, M. Birbeck, J. Exp. Med., **124**, 141 (1966).
3. H. Antweiler, Beitr. Silikoseforsch. Pneumokon., **22**, 93 (1970).
4. E. G. Beck, *Die Reaktion in vitro gezüchter zellen auf partikelförmige Luftverunreiningungen und hochspolymere*. Stoffe-Köln, Opladen Westd. Verl. 1970. Forschungsberichte des Landes Nordrhein-Westfalen, nr. 2083.
5. P. F. Holt, Brit. J. Industr. Med., **28**, 72 (1971).
6. G. Junge-Hulsing, H. Wagner, H. J. Einbrodt, Beitr. Silikose Forsch., **94**, 41 (1968).
7. J. M. Lauweryns, J. H. Baert, Amer. Rev. Resp. Dis., **115**, 625 (1977).
8. T. Nash, A. C. Allsion, J. S. Harlington, Nature **210**, 259 (1966).
9. B. Pernis, E. C. Vigliani, L. Monaco, Med. Lavoro **51**, 3 (1960).
10. E. C. Vigliani, B. Pernis, L. Monaco, *Inhaled Particles and Vapours*, Pergamon Press, Davies C.M. ed., 1961, p. 348.
11. E. C. Vigliani, *Encyclopedie de Médecine d'Hygiène et de Sécurité du Travail*. B.I.T.—Gèneve 1974, p. 1507
12. D. James, J. Marks, J. Hygiene, **54**, 342 (1956).
13. F. M. Engelbrecht, F. J. Burger, Proc. Pneumocon. Confer. Johannesburg, London, 1961, p. 469
14. I. V. Pavlova, V. I. Fedorova, Vopr. Med. Chim., **9**, 125 (1963).
15. J. Charbonnier, H. Daniel-Moussard, P. Iselin, J. L. Soule, C. R. Soc. Biol., **153**, 1492 (1959).
16. E. J. Kino, E. Schmidt, W. Roman, P. R. Kind, Enzymology, **17**, 341 (1966).
17. T. A. Kilroe-Smith, Maria Breyer, Proc. Pneumocon. Confer. Johannesburg, London, L. & A. Churchill Ed. 1961, p. 461.
18. T. A. Kilroe-Smith, Maria Breyer, Brit. J. Industr. Med., **20**, 243 (1963).
19. T. A. Kilroe-Smith, Maria G. Breyer, H. Prinsloo, Brit. J. Industr. Med., **21**, 35 (1964).
20. F. Rilke, R. W. Kesel, Med. Lavoro, **54**, 161 (1963).
21. B. Barhard, I. Goldstein, G. Rotaru, V. David, Med. Lavoro **57**, 579 (1966).
22. R. Barhad, I. Goldstein, G. Rotaru, V. David, Stud. Cercet. Igienă și Sănătate Publică, București 1967, p. 37.
23. B. Barhad, I. Goldstein, G. Rotaru, V. David, Al 2-lea Congres Național de Igienă, București, 1968, vol. rap. p. 150.
24. B. Barhad, I. Goldstein, G. Rotaru, V. David, Simpoz. enzime și izoenzime în patologie, București, 1968, în vol. 1969, p. 14.
25. L. M. Engelbrecht, F. J. Burger, S. Afr. Lab. Clin. Med., **7**, 22 (1961).
26. Ibidem, **40**, 974 (1966).
27. Ibidem, **42**, 1142 (1968).
28. B. Barhad, G. Rotaru, I. Lăzărescu, Internat. Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg., **24**, 148 (1967).
29. B. Barhad, I. Goldstein, G. Rotaru, I. Lăzărescu, XVI-th Int. Congr. Occupat. Health, Tokyo 1960, în vol. abstr. p. 137.
30. B. Barhad, G. Rotaru, I. Lăzărescu, I. Goldstein, Elena Selegean, Stela Jugănaru, V. David, Proc. IV Internat. Pneumoc. Confer. Bucharest, Ed. Apimondia Publish. House 1971, p. 315.
31. Q. N. Myrvik, Eva Soto Leake, Bruce Farris, J. Immun., **86**, 128 (1961).
32. H. Bergmeyer, *Methods of Enzymatic Analysis*. Acad. Press, N. V. London 1963, p. 736.
33. D. Wharton, A. Tzagaloff, Ibidem, vol. **X**, Acad. Press, N.Y., London 1969, p. 245.
34. A. C. Allsison, Ann. Acad. Sci. N. Y., **221**, 299 (1974).
35. Z. A. Cohn, *Mononuclear Phagocytes*. R. van Furth Ed. R. Blackwell Scientific Publications, Oxford & Edinburgh, 1970, p. 121.

36. Elena Parazzi, G. Secchi. B. Pernis, E. Vigliani, Arch. Environ-Health., **17**, 850 (1968).
37. B. Vernon-Roberts, *The Macrophage*, R. J. Harrison, Mc. Minn ed. Cambridge, University Press 1972, p. 326.
38. G. Rotaru, Smaranda Constantinescu, Gabriela Filipescu, Elena Ratea, Rev. Roum. Morphol. Embryol., Ed. Acad. R.S.R., **24**, 149 (1978).
39. H. Baumann, W. Klosterkotter, K. Robock, *Ergebnisse von Untersuch.* Gebiet Staub Silikosebekämpfung im Steinkohlenbergbau, **6**, 33 (1967).
40. R. Comolli, J. Pathol. Bacteriol., **93**, 241 (1961).
41. H. Antweiler, W. Denhen, Schmiedberg's Arch. Pharmacol., **266**, 290 (1970).
42. H. Antweiler, F. Pott, E. G. Beck, M. Grunspan, Proc. IV. Intern. Conf. Pneumocon., Bucharest, Apimondia Publishing House, Bucharest 1973, p. 309.
43. E. G. Beck, P. F. Holt, N. Manoilovici, Brit. J. Industr., Med., **29**, 280 (1972).
44. M. Nosal, Sympos. sur les Pneumoconioses, Katowice 1967, p. 237.
45. E. Yokomura, Y. Seno, K. Sakabe, A. N. Nakatsura, T. Kubo, Acta Med. Okayama, **21**, 93 (1967).
46. V. V. Portugalov, G. N. Durnova, A. S. Kaplasnsky, N. S. Kolganova., Acta Histochem., **46**, 216 (1973).
47. W. Klosterkotter, K. Robock, *Ergebnisse von Untersuchungen auf dem Gebiet der Staub- und Silikosebekämpfung im Steinkoholenbergbau* (Det. mold) **6**, 51 (1967).
48. Ibidem, *6*, 54 (1967).
49. V. R. Potter, W. C. Schneider, J. Biol. Chem., **142**, 543 (1942).
50. K. Robock, W. Klosterkotter, *Ergebnisse von Untersuchungen auf dem Gebiet der Staub und Silikosebekämpfung im Steinkohlenbergbau* (Det. mold.), **6**, 59 (1967).

COMPORTAREA FOSFATAZELOR ALCALINE ŞI ACIDE HEPATICE ÎN DIABETUL ALOXANIC

V. DARIE*), M. ŞERBAN**)

Rezumat. Diabetul produs la şobolani prin administrare de aloxan determină modificări semnificative ale activităţii fosfatazelor alcaline şi acide din ficat. În comparaţie cu lotul martor, activitatea fosfatazei alcaline scade cu 71%, iar cea a fosfatazei acide creşte cu 35%. Se discută posibilităţile prin care aloxanul poate induce modificări ale activităţii fosfatazei alcaline.

Aloxanul este considerat ca unul din cei mai selectivi agenţi de inhibiţie enzimatică care reacţionează probabil printr-un mecanism de blocare a grupărilor -SH sau al unor metale cu rol de cofactori enzimatici (1). Cu toate acestea, sînt semnalate şi cazuri în care anumite enzime ca : fosfataza acidă (2), sorbitol-dehidrogenaza, ornitin-carboimil-transferaza (3) sînt activate în prezenţa aloxanului printr-un mecanism încă necunoscut.

Pînă nu demult, se considera că activitatea fosfatazelor este legată în special de metabolismul sistemului osos, dar lucrări elaborate în ultimul deceniu semnalează modificări ale activităţii acestor enzime şi în alte afecţiuni (4).

Diabetul zaharat, maladie foarte complexă datorită complicaţiilor multiple pe care le determină, induce şi modificări la nivelul fosfatazelor. S-a demonstrat că aceste enzime, pe lîngă rolul lor de a elibera fosfaţi din esterii respectivi, sînt implicate şi în transportul activ al fosfaţilor prin peretele celular şi prin urmare ar fi într-o interdependenţă cu metabolismul glucidic (4).

Într-o lucrare anterioară (5), am arătat că în diabetul aloxanic se produce o inhibare a glicolizei cu diminuarea semnificativă a activităţii aldolazei şi lactatdehidrogenazei. În continuarea acestor cercetări, în prezenta lucrare, ne-am propus să urmărim comportarea fosfatazelor hepatice în diabetul experimental produs prin administrarea de aloxan.

MATERIAL ŞI METODE

S-a lucrat pe şobolani masculi din rasa Sprague-Dowley de 6—8 luni şi cu o greutate cuprinsă între 225—335 g. Experienţele s-au efectuat pe două loturi : un lot normal (10 şobolani) şi un lot la care s-a administrat aloxan (10 şobolani).

Inducerea diabetului aloxanic s-a realizat prin injectarea intraperitoneală a unei doze de aloxan de 12,5 mg/100 g corp în soluţie tampon fosfat-citrat de pH 3,5 în concentraţie de 10 mg/ml. Instaurarea stării diabetice a fost stabilită prin dozarea periodică a glicemiei, probele de sînge fiind recoltate prin puncţie cardiacă. Determinarea glicemiei a relevat o manifestare trifazică, considerîndu-se că şobolanii sînt în stare diabetică atunci cînd s-a instalat faza de hiperglicemie permanentă cu valori cuprinse între 450—650 mg glucoză/100 ml plasmă. Animalele au fost sacrificate prin exanghinare cardiacă. Sîngele a fost recoltat

St. cerc. biochim., 22, 2, 133—136 (1979)

pe heparină, iar din plasma obţinută prin centrifugare s-a dozat glucoza prin metoda cu ortotoluidină (6); valorile glicemiei au fost exprimate în mg glucoză/100 ml. Ficatul prelevat a fost spălat repetat cu ser fiziologic la rece şi ulterior a fost omogenizat cu ajutorul unui omogenizator POTTER în tampon de extracţie TRIS-HC_1 0,2 M de pH 7,4. Raportul de extracţie a fost de 1 g ţesut la 3 ml tampon. Omogenatul a fost centrifugat la rece timp de 30 minute la 5 000 × g. Supernatantul obţinut a fost diluat în apă distilată în proporţie de 1/9. Acest extract a fost utilizat pentru dozarea activităţilor fosfatazelor alcaline şi acide.

Dozarea activităţii enzimatice a fosfatazelor alcaline şi acide s-a efectuat prin metoda cu paranitrofenil fosfat (6). Rezultatele au fost exprimate în micromoli paranitrofenil fosfat/ /min/g proteină şi au fost prelucrate statistic.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În tabela 1 şi figura 1, sînt prezentate în mod comparativ activităţile enzimatice ale fosfatazelor alcaline şi acide din ţesutul hepatic la lotul normal şi lotul tratat cu aloxan

Tabela 1

Activităţile specifice ale fosfatazei alcaline şi acide, la lotul normal şi la cel tratat cu aloxan.

Loturi	Fosfataza alcalină. micromoli PNF/min/g proteină	Fosfataza acidă. Micromoli/ PNF/min/g/ proteină
Ficat normal X±S m	0,57±0,03	7,82±0,25
Ficat tratat cu aloxan X±S m	0,17±0,01	10,62±0,60
Testul „Student"	12,0130 $\frac{S}{p<0,001}$	4,2797 $\frac{S}{p<0,001}$
Activitate faţă de normal %	28,84 %	135,77 %
Inhibiţie %	71,16 %	—

Din datele obţinute rezultă că activitatea fosfatazei alcaline hepatice scade semnificativ pînă la 28,84 % din activitatea înregistrată la lotul martor, adică se înregistrează o inhibiţie de 71,16% la lotul aloxanizat. Datele sînt comparabile cu cele cunoscute în literatură, ca de exemplu inhibiţia fosfatazei alcaline la rinichiul de porc (1).

În cazul fosfatazei acide, se constată însă o creştere semnificativă cu 35,77% la lotul tratat cu aloxan, în comparaţie cu lotul martor. Precizăm că în literatura de specialitate nu este menţionată această observaţie în cazul ficatului, ci numai în cazul plasmei (2). Analizînd rezultatele obţinute, rezultă că tratarea cu aloxan determină o acţiune diferită asupra celor două enzime, şi anume o inhibiţie a fosfatazei alcaline şi respectiv o activare a fosfatazei acide. Dacă ţinem seama de faptul că fosfataza alcalină este o glicoproteină avînd în centrul său activ gruparea

amino a lizinei, gruparea -SH a cisteinei și ionul de zinc drept cofactor, rezultă că observația experimentală menționată este în concordanță cu ipoteza emisă de Lazarow (7), care atribuie aloxanului un rol de inhibitor al grupării -SH, ca și cu teoria lui Okamato (8) care consideră aloxanul ca un agent de chelatare, captînd în special zincul.

Apreciem că inhibiția pronunțată a activității fosfatazei alcaline reprezintă efectul cumulat al aloxanului asupra grupărilor tiol și asupra zincului din molecula metalenzimei. Faptul că activitatea fosfatazei acide înregistrează o creștere la lotul aloxanizat este o dovadă că teoriile menționate mai sus nu au o aplicabilitate cu caracter general. De altfel, este cunoscut faptul că activitatea fosfatazei acide serice este crescută în diabetul aloxanic (2), ceea ce este în deplină concordanță cu observațiile

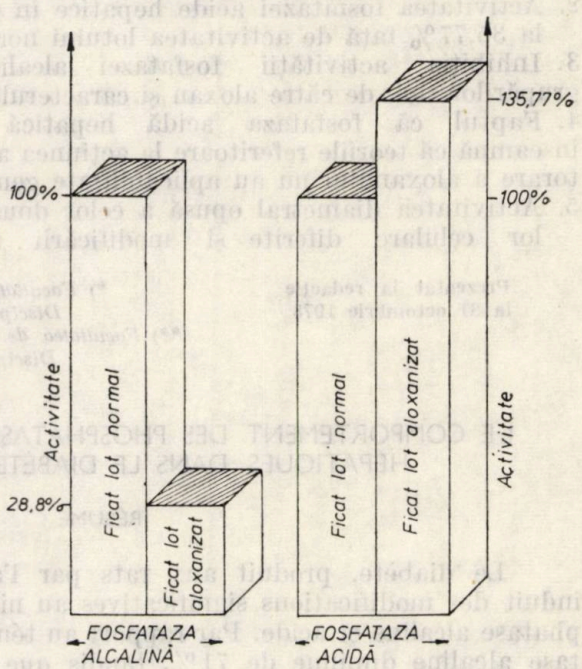


Fig. 1. — Activitățile enzimatice ale fosfatazelor alcaline și acide din ficat provenit de la șobolani normali și cu diabet aloxanic.

noastre și în contradicție cu ipoteza lui Lazarow (7). Modul de comportare a celor două enzime cu acțiune similară poate fi atribuit și localizării diferite a acestora în organitele celulare, și anume mitocondria pentru fosfatazele alcaline și lizozomul pentru fosfatazele acide.

Dacă la nivelul serului creșterea activității fosfatazei acide poate fi consecința agresiunii aloxanice asupra lizotomilor pancreatici în cazul țesutului hepatic se poate admite un efect similar și mai puțin probabil un proces de biosinteză accentuată a acestei enzime la nivelul ficatului.

Scăderea activității fosfatazelor alcaline hepatice poate fi corelată și cu o tulburare a metabolismului energogenerator, determinată prin anumite modificări la nivelul metabolismului glucidic, în sensul celor semnalate într-o lucrare anterioară (5).

De asemenea, nu este exclus ca activitatea fosfatazelor să fie corelată cu efectul exercitat de aloxan asupra eliminării de corticosteroizi

(9). Se poate astfel presupune că activitatea diametral opusă a celor două enzime s-ar datora, pe lîngă origini celulare diferite, şi unei influenţe hormonale directe (10), respectiv modificării raportului insulină/glucagon.

Corelarea rezultatelor obţinute de noi cu cele constatate în diabetul uman întăresc justeţea afirmaţiei că diabetul aloxanic reprezintă o modalitate experimentală utilă pentru înţelegerea şi elucidarea mecanismelor intime ale diabetului zaharat uman.

CONCLUZII

1. Activitatea fosfatazei alcaline hepatice scade în diabetul aloxanic pînă la 28,84% faţă de activitatea lotului normal.
2. Activitatea fosfatazei acide hepatice în diabetul aloxanic creşte pînă la 35,77% faţă de activitatea lotului normal.
3. Inhibiţia activităţii fosfatazei alcaline se datoreşte inhibiţiei grupărilor tiol, de către aloxan şi caracterului chelator al acestuia.
4. Faptul că fosfataza acidă hepatică înregistrează o activare, înseamnă că teoriile referitoare la acţiunea asupra grupărilor tiol şi chelatorare a aloxanului nu au aplicabilitate generală.
5. Activitatea diametral opusă a celor două enzime s-ar datora originii lor celulare diferite şi modificării raportului insulină/glucagon.

Prezentat la redacţie
la 31 octombrie 1978

*) *Facultatea de Medicină Craiova*
Disciplina de Biochimie
**) *Facultatea de Medicină Veterinară Bucureşti*
Disciplina de Biochimie

LE COMPORTEMENT DES PHOSPHATASES ALCALINE ET ACIDE HÉPATIQUES DANS LE DIABÈTE ALLOXANIQUE

RÉSUMÉ

Le diabète, produit aux rats par l'administration de l'alloxane, induit des modifications significatives au niveau de l'activité de la phosphatase alcaline et acide. Par rapport au témoin, l'activité de la phosphatase alcaline diminue de 71%, tandis que l'activité de la phosphatase acide augmente de 35%. On discute les possibilités de l'alloxane d'induire des modifications de l'activité de la phosphatase alcaline.

BIBLIOGRAFIE

1. J. LEYDEN, WEBB, *Enzyme and metabolic inhibitors*, vol. III, Acad. Press New York London (1966).
2. A. SNEER, VERONICA STROIA, Rev. Roum Endocrinol, **7**, 319 (1970).
3. V. DARIE, D. TĂNĂSESCU, Acta diabetologica romana (1978) (sub tipar).
4. S. POSEN, Alkaline Phosphatase. Ann. intern Med., **67**, 183 (1967).
5. V. DARIE, M. ŞERBAN, St. cerc biochim., **22**, 11 (1979).
6. R. RICHTERICH, *Clinical chemistry*; *Theory and practice*. Acad. Press, New York, London (1969).
7. A. LAZAROW, *Experimental diabetes*. Springfield (III): CH. C. THOMAS Publ. Co (1954).
8. Y. INOUE, Endocrinol Japon, **15**, 1 (1968).
9. A. SNEER, MARCELA DINU, VERONICA STROIA, St. cerc. endocrinol, **22**, 267 (1970).
10. M. JONADET, J. P. TURCHIMI, P. BASTIDE, Pathol, et Biol. **16**, 927 (1968).

RELAŢII ÎNTRE CONCENTRAŢIA ACIZILOR BILIARI ŞI CAPACITATEA LITOGENĂ A BILEI UMANE

ILEANA FUNDUC, R. CIUPE*), E. FĂGĂRĂŞAN**)

Rezumat. Se arată rolul acizilor biliari împreună cu al fosfolipidelor în evitarea formării unei bile litogene. Se reprezintă grafic (triangular şi ortogonal) şi numeric, cele trei lipide biliare principale, prin raportul lor; se fac cunoscute valorile absolute ale acestora, obţinute pe un număr mic de bile hepatice. Se descrie final utilitatea imediată a acestor date şi valoarea lor prognostică în litogeneză, cît şi limitele acestui proces.

Sărurile biliare (formele sub care se găsesc acizii biliari în bila umană), afară de rolul de solvent al lipidelor digestive din intestin, solubilizează lecitina şi colesterolul biliar care altfel sînt şi ele lipide insolubile endogene. Putem considera deci sărurile biliare ca fiind biolipide cu proprietăţi detergente ce formează un înveliş hidrosolubil în jurul moleculelor hidroinsolubile. Această proprietate a lor este de mare importanţă pentru a menţine colesterolul biliar neprecipitat, în felul acesta evitîndu-se formarea bilei litogene.

Modelele de reprezentare grafică triangulare sau ortogonale, cît şi cele numerice existente în literatură (1), (2), (3), (4), reflectă în esenţă compoziţia lipidică a bilei la un moment dat, adică, principalii parametri de care depinde capacitatea ei litogenă.

În lucrarea de faţă se va încerca să se arate dependenţa capacităţii sale litogene de compoziţia lipidică biliară.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-a lucrat pe 5 bile hepatice (recoltate pe tub Kehr şi păstrate la −20°C) care au provenit de la un bolnav la care s-a efectuat desfacerea anostomozei colecisto-duodenale, fără calcul (proba 1) şi de la 4 bolnavi cu litiază a căilor hepatice principale la care s-au practicat colecistectomii cu coledocotomii (probele 2, 3 şi 5) şi hepato-jejunostomie cu drenajul Kehr pentru calibrare transanastomotică (proba 4).

Bilele au fost centrifugate în prealabil cu vată pentru îndepărtarea mucusului şi a corpilor străini.

Acizii biliari s-au determinat gaz cromatografic după metoda arătată de noi anterior (5). În plus, am verificat unul din acizii biliari separaţi (acidul litocolic) prin cuplarea gaz cromatografiei cu spectrometria de masă pe baza datelor lui Eneroth şi col. (6) şi ale lui Harris şi col. (7).

Colesterolul s-a determinat cu metoda Rappaport şi Eichhorn (8) adaptată pentru bilă (9).

Fosfolipidele (lecitina) s-au determinat prin metoda clasică de formare finală a albastrului de molibden (10).

REZULTATE

Valorile concentrațiilor componenților studiați sînt arătate în tabela 1, unde s-au alăturat și valorile normale din literatură (acolo unde acestea au existat).

Tabela 1

Compoziția lipidică a bilei hepatice

Componentul biliar	Unit. de măsură	Val. norm.	Proba 1	Proba 2	Proba 3	Proba 4	Proba 5
Acid colic	mg/ml		25	85	60	90	65
Acid dezoxicolic	mg/ml		15,5	37,5	11	12,5	34
Acid litocolic	mg/ml		3	4,5	2,5	3	9
Acid chenodezoxicolic	mg/ml		42,5	30	45	55	30
Acizi biliari totali	mg/ml		86	157	118,5	160,5	138
Colesterol	mg%	60–310 (11) (12)	440	440	930	270	525
Fosfolipide	mg%	100–710 (13) (14)	26,75	36,5	25	25	340

Sprijinindu-ne pe considerațiile lui Sjövall (15) ce susține că raportul acizi glicocolici/acizi taurocolici cu care se conjugă sărurile biliare este de 3, că din cele 4 săruri conjugate numai 3 sînt semnificative ca proporție (glicolitocolatul și taurolitocolatul se găsesc sub formă de urme (16)) și considerînd că metalul alcalin ce intră obișnuit în compoziția sărurilor biliare este sodiul, am calculat concentrația relativă a acestor săruri existente în bilele hepatice studiate. Exprimînd concentrațiile de săruri biliare, colesterol și fosfolipide în mM%, se poate reprezenta după Admirand și Small (1), compoziția lipidică a probelor pe coordonate triangulare (fig. 1).

Tabela 2

Variația indexilor litogenici la bila hepatică

Felul mărimii	Modul de exprimare	Proba 1	Proba 2	Proba 3	Proba 4	Proba 5
Colesterolul actual $(CH)_a$	mM %	5,2	3,0	7,4	1,5	4
Colesterol$_{max.solubilizat}$ $(CH)_s$	mM %	5,2	5,9	5,8	6	6,9
Index litogenic $= \frac{(CH)_a}{(CH)_s}$	—	1	0,5	1,2	0,2	0,5
Sat. proc. = Index lit. × 100	—	100	50	120	20	50

Reprezentarea mai simplă a lui Thomas și Hofmann (2) pe coordonate ortogonale, analoagă ca aspect cu cea anterioară este prezentată în figura 2.

Pentru a concretiza numeric datele reprezentate grafic, s-a calculat după Metzger și col. (3) „indexul litogenic" și după Redinger și Small (4) „saturarea procentuală", cu ajutorul mărimii „solubilitatea maximă a colesterolului" (Tabela 2).

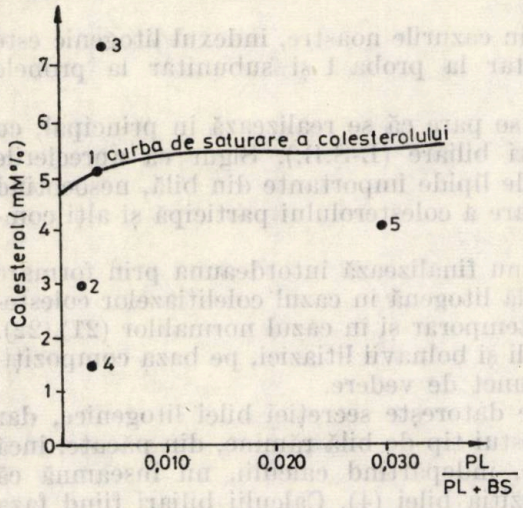


Fig. 1. — Compoziția lipidică a bilei hepatice (reprezentare pe coordonate triangulare)

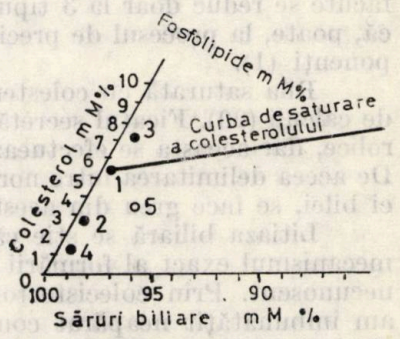


Fig.2. — Compoziția lipidică a bilei hepatice (reprezentare pe coordonate ortogonale)

DISCUȚII

În valori absolute, cazurile studiate, în ceea ce privesc acizii biliari, s-au apropiat de modelele normale ale bilei hepatice: toate au conținut 80% acizi colic și chenodezoxicolic (17), restul fiind în principal acid dezoxicolic, de asemenea 25—60% acid colic, 5—25% acid dezoxicolic și mai puțin de 5% acid litocolic, în cazul proporției acidului chenodezoxicolic (30—50%) încadrîndu-se doar probele 1,3 și 4 (14). Probele 2 și 5, în schimb, au corespuns proporției normale de 20—30% acid chenodezoxicolic indicată de Messini și col. (18), proporția de 8—10% pentru acidul dezoxicolic corespunzînd doar pentru probele 3 și 4.

Colesterolul s-a găsit în valoare normală doar la proba 4, restul fiind extrem de crescute, maximul atingîndu-l proba 3.

Valorile fosfolipidelor au fost deosebit de scăzute, proba 5 ceva mai crescută, dar situîndu-se în domeniul normal.

Arătîndu-se mai importante ca valorile absolute ale sărurilor biliare, lecitinei și colesterolului, raporturile între aceste mărimi (19), reprezentările grafice reflectă compoziția lipidică a unei bile în ceea ce privește starea ei litogenă față de zona limită a maximului de solubilitate a colesterolului. Probele 2, 4, 5 sînt situate sub curba de solubilitate maximă a colesterolului, proba 1 pe această curbă și proba 3 deasupra acesteia. De aici se poate deduce că, prin intervenția chirurgicală și extirparea vezicii cu calculii din ea, s-a reușit îmbunătățirea compoziției bilei pentru

cazurile 2, 4 și 5, dat fiind că pe moment nu există pericolul precipitării colesterolului. Nu se poate spune același lucru, însă, pentru cazul 3 care, după cum este localizat, probabil mai conține calculi așezați undeva, pe traiectul coledocian. Cazul 1, deși nu a prezentat calculi la intervenție, este o bilă cu potențial litogenic crescut, capabilă oricînd să precipite colesterolul.

După cum era de așteptat în cazurile noastre, indexul litogenic este supraunitar doar la proba 3, unitar la proba 1 și subunitar la probele 2, 4 și 5.

Solubilizarea colesterolului se pare că se realizează în principal, cu ajutorul sistemului lecitină-săruri biliare (L-S.B.). Sigur că aprecierile făcute se reduc doar la 3 tipuri de lipide importante din bilă, nesocotind că, poate, la procesul de precipitare a colesterolului participă și alți componenți (1).

Bila saturată cu colesterol nu finalizează întotdeauna prin formare de calculi (20). Ficatul secretă bilă litogenă în cazul colelitiazelor colesterolice, dar aceasta se efectuează temporar și în cazul normalilor (21),(22). De aceea delimitarea între normali și bolnavii litiazici, pe baza compoziției bilei, se face greu din acest punct de vedere.

Litiaza biliară se știe că se datorește secreției bilei litogenice, dar mecanismul exact al formării acestui tip de bilă rămîne, din păcate, încă necunoscut. Prin colecistectomie, îndepărtînd calculii, nu înseamnă că am îmbunătățit neapărat compoziția bilei (4). Calculii biliari fiind faza finală a patogenezei bolii, nu este imposibilă prezența cu luni, ani sau chiar decade, a substanței promotoare lor, dacă aceștia se formează cîndva.

Din cele expuse, reiese importanța celor trei componente principale biliare în reflectarea capacității litogenice a bilei și deci în aprecierea eficienței actului operator, cît și a unui prognostic cu privire la geneza unei noi litiaze biliare.

Prezentat la redacție
la 10 octombrie 1978

Spitalul Clinic Fundeni,
Clinica de Hematologie,
București
*) *Institutul de Igienă și Sănătate Publică, Cluj*
**) *Institutul Medico-Farmaceutic,*
Catedra de Biofizică, Cluj

RELATIONSHIPS BETWEEN THE CONCENTRATION OF BILIARY ACIDS AND THE LITHOGENOUS CAPACITY OF THE GALL

SUMMARY

The role of biliary acids as well as of phospholipids to avoid the formation of a lythogenous gall is exposed. The three main biliary lipids are both numerically and graphically (triangular and orthogonal) represented by their ratio; their absolute values obtained through a small number of hepatic biles are disclosed. The immediate usefulness of these data and their prognostic value in lithogenesis with the limitations in the understanding of this process are finally described.

BIBLIOGRAFIE

1. W. H. Admirand, D. M. Small, J. Clin. Invest., **47**, 1043 (1968).
2. P. J. Thomas, A. F. Hofmann, Gastroenterology, **65**, 698 (1973).
3. A. L. Metzger, S. Heymsfield, M. S. Grundy, Gastroenterology, **62**, 499 (1972).
4. R. N. Redinger, D. M. Small, Arch. Intern. Med., **130**, 618 (1972).
5. R. Ciupe, I. Funduc, D. Tăpălagă, Studii și Cercet. bioch., **21** (1978).
6. P. Eneroth, B. Gordon, R. Ryhage, J. Sjövall, J. of Lip. Res., **7**, 511, (1966).
7. W. S. Harris, L. Marai, J. J. Myher, M. T. Ragitubiah, J. of Chrom., **131**, 437 (1977).
8. F. Rappaport, F. Eichhorn, Clin. Chim. Acta, **5**, 160 (1960).
9. E. Andrews, L. Hrdina, Proc. Soc. Exper. Biol., **29**, 1102 (1932).
10. * * * Klinisches Labor. 11 Auflage der Medizinische Chemischen Untersuchungen Methoden, Merck, Darmstadt (1970).
11. A. A. Arianoff, Acta Gastr. Belg., **29**, 733 (1966).
12. W. Vander, Linden, A. Norman, Acta Chir. Scand., **133**, 307 (1967).
13. R. P. Cook, în *Cholesterol chemistry, biochemistry and pathology*, N.Y., Academic Press, Inc., 1958.
14. E. Soru, în *Biochimie Medicală*, vol. I, Ed. Med., **288**, 333 (1973).
15. J. Sjövall, Clin. Chim. Acta, 5, 33 (1960).
16. M. Rautureau, J. Rautureau, Arch. Fr. Mal. App. Dig., **60**, 445 (1971).
17. J. M. Dietschy, E. W. Moore, J. Clin. Invest., **43**, 1551 (1964).
18. M. Messini, G. Ricci, M. Crespi, U. Bani, Presse Med., **74**, 670 (1966).
19. B. Isaksson, Acta Soc. Med. Upsaliensis, **59**, 296 (1953—54).
20. L. J. Schoenfield, Gastroenterol., **67**, 725 (1974).
21. T. C. Northfield, A. F. Hofmann, Lancet, **1**, 747 (1973).
22. A. L. Metzger, R. Adler, S. Heymsfield, N. Engl. J. Med., **288**, 333 (1973).

REPERCUSIUNILE ABUZULUI DE ALCOOL ASUPRA STĂRII DE NUTRIŢIE TIAMINICĂ

VIORICA GORCEA, ELENA BISTRICEANU, DESPINA COCORA

Rezumat. S-a cercetat starea de nutriţie tiaminică la 81 alcoolici internaţi în Centrul de dezalcoolizare CULA şi clinicile medicale C.F.R.$_2$ şi Griviţa – Bucureşti. Indicatorii biochimici urmăriţi au fost comparaţi cu cei obţinuţi la grupul martor. Scăderea semnificativă a activităţii transcetalazei eritrocitare şi a eliminării procentuale din cantitatea de vitamină B_1 injectată, arată că sub acţiunea alcoolului scade disponibilul de tiamină — metabolic activă — de la nivelul organelor. Creşterea piruvemiei, piruvuriei şi lactacidemiei, confirmă deficienţa tiaminică la alcoolici. Creşterea raportului lactat/piruvat care reflectă schimbarea potenţialului redox la nivelul celulei hepatice, indică tulburări profunde a diverselor căi metabolice. Din anamneza alimentară şi excreţia tiaminei prin urină, reiese că la alcoolicii studiaţi, aportul de vitamină B_1 a fost normal iar hipotiaminoza se datoreşte tulburărilor de metabolizare normală a vitaminei B_1.

Alcoolismul reprezintă o problemă medico-socială viu discutată în lumea întreagă mai ales că foarte multe victime aparţin populaţiei tinere.

Se cunoaşte bine rolul etiologic al alcoolului în ciroze, în agravarea evoluţiei bolilor cronice, în afectarea sistemului nervos sau influenţa asupra potenţialului genetic. De asemenea, prin foarte multe cercetări s-a arătat că prin efectuarea tractusului gastrointestinal şi a celulei hepatice, alcoolul micşorează aportul de vitamine şi utilizarea lor în procesele metabolice (1). Tiamina, vitamină cu rol cheie în desfăşurarea normală a lanţurilor metabolice, în special în metabolizarea glucidelor care necesită prezenţa unor enzime a căror coferment este alcătuit din tiamin-pirofosfat, suferă în alcoolism atît o scădere a aportului cît şi o utilizare defectuoasă la nivelul celulei hepatice (11, 14).

Sistemul nervos este foarte sensibil faţă de produşii metabolici (normali sau anormali) acumulaţi în insuficienţa sistemelor enzimatice dependente de tiamină şi dacă disponibilul de vitamină B_1 se prelungeşte, apar tulburări psihice şi neurologice.

Aprofundarea cunoştinţelor privind tulburarea lanţurilor metabolice determinate de hipotiaminoza din alcoolism reprezintă o problemă medicală foarte importantă. Trebuie ţinut seama că reacţiile moleculare condiţionează starea funcţională iar alterările biochimice se transformă în leziuni morfofuncţionale care la rîndul lor sînt răspunzătoare de apariţia unor sindroame neurologice din alcoolism. Dar aici este o complexitate şi o interrelaţie a fenomenelor greu de precizat care necesită studii profunde, multidisciplinare. În speranţa de a contribui la elucidarea unor probleme mai sus amintite şi ţinînd seama de faptul că în literatura de

specialitate am găsit puține lucrări privind starea tiaminică la alcoolici, că cercetările respective au folosit un număr redus de indicatori și aceștia nu au fost corelați cu rezervele tiaminice din organism, am inițiat prezenta cercetare.

MATERIAL ȘI METODĂ

Cercetările s-au efectuat pe 81 alcoolici internați la Centrul de Dezalcoolizare C.U.L.A. și Clinicile Medicale C.F.R.$_2$ și Griviția—București. Diagnosticul de alcoolism a fost stabilit de către medicii specialiști din unitățile respective. Din discuțiile purtate cu fiecare bolnav în parte a reeșit că aceștia consumau cantități însemnate de alcool, peste 1 g alcool/kg corp/zi și la majoritatea se instalase fenomenul de alcoolo-dependență. S-a urmărit ca nici o persoană studiată să nu fi făcut recent tratament cu vitamina B_1 și — deși se cunosc valorile indicatorilor studiați pentru persoanele sănătoase și care dispun de tiamină, totuși ținînd seama de variația lor în funcție de mărimea aportului (de exemplu : variațiile după anotimp) în aceeași perioadă cercetările au cuprins și un număr de 18 persoane sănătoase, colegi de laborator sau prieteni care nu consumau alcool sau îl consumau în cantități reduse.

Pentru aprecierea tulburărilor provocate de alcool în aprovizionarea organismului cu tiamină, s-au urmărit concomitent mai multe grupe de indicatori.

1. Indicatori care să ne informeze în ce măsură abuzul de alcool influențează direct asupra concentrației de tiamină din organism. În acest scop s-a determinat tiaminuria prin metoda tiacromului, modificată de Haugen (9) iar concentrația obținută s-a raportat la gram de creatinină. Testul de încărcare cu vitamina B_1 (5), care pune în evidență gradul de saturare sau deficitul de tiamină la nivelul organelor, s-a făcut prin administrarea i.m. înainte de masă a 50 γ vitamină B_1/kg.corp imediat după golirea vezicii urinare, apoi după 3 ore s-a recoltat din nou urina în care s-a dozat tiamină și cunoscînd concentrația vitaminei înainte de încărcare s-a putut calcula eliminarea procentuală din cantitatea injectată.

2. Utilizarea tiaminei de către unele sisteme enzimatice a căror coferment este alcătuit din tiaminpirofosfat. Dintre aceastea s-a determinat activitatea transcetolazei eritrocitare după tehnica lui Brin (1).

3. Schimbări în asigurarea întregului organism cu tiamină s-au urmărit și indirect, atît prin dozarea piruvemiei și piruvuriei cît și lactacidemiei. Dozarea acidului piruvic s-a făcut după metoda spectrofotometrică a lui Friedemann și Haugen (4) iar a acidului lactic după micrometoda spectrofotometrică a lui Barker (7).

4. Deoarece sub acțiunea alcoolului se produce, la nivelul ficatului, modificarea stării redox datorită schimbării raportului $NADH_2$/NAD, în sînge, s-a determinat raportul lactat/piruvat, care reflectă modificarea potențialului redox la nivelul țesuturilor periferice și care este strict legat de cel hepatic (2, 3).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Din datele individuale obținute pentru fiecare indicator și grup în parte s-au calculat valorile medii cu abaterea standard iar interpretarea rezultatelor consemnate în tabela 1 s-a făcut prin compararea celor 2 grupe contînd atît pe semnificația statistică a diferențelor cît și pe deosebirile procentuale dintre medii.

La alcoolici concentrația tiaminei în urină a fost cu 4% mai scăzută decît la persoanele sănătoase dar diferența nu a fost semnificativă. Cu toate acestea la 3 ore după administrarea intramusculară a aceleiași doze de vitamină B_1, eliminarea procentuală din cantitatea injectată a fost cu 35,7% mai redusă la alcoolici, diferența fiind puternic semnificativă ceea ce dovedește că sub acțiunea alcoolului scade disponibilul de tiamină de la nivelul organelor.

Tabela 1

Valoarea medie a indicatorilor stării de nutriție tiaminică la alcoolici în comparație cu persoanele sănătoase

Grupul de persoane	Nr. Pers. Stud.	Tiaminuria		Activitatea transcetolazei eritrocitare µg hexoză/ /ml/h	LACTACIDEMIA mg %	PIRUVEMIA mg %	LACTAT/ PIRUVAT	PIRUVURIA mg/g CREATININA
		γ/g creatină	% din cant. inject.					
Alcooldependente	81	259,0±22,6	26,5±2,5	615,6±33,2	13,9±1,06	1,81±0,07	7,7	24,5±1,4
Martori	20	290,4±28,1	41,2±3,3	836,2±15,1	8,10±0,79	1,49±0,04	5,7	20,6±1,7
Variații procentuale față de martor (%)		−4,0	−35,7	−26,4	+71,0	+20,8	+35	+23,3
Semnificația statistică a diferențelor (P)		N	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		<0,05

O confirmare de necontestat a unei deficienţe tiaminice determinate de alcool este reducerea semnificativă ($p < 0{,}001$) a activităţii transcetalozei eritrocitare. Trebuie precizat că activitatea acestei enzime — socotit indicatorul cel mai sensibil şi valoros al stării de nutriţie tiaminică — este strict dependentă de tiaminpirofosfat (forma reactivă a tiaminei din organism) şi dacă aportul de vitamină B_1 este suficient sau chiar crescut, dar celula hepatică nu poate transforma tiamina în tiaminpirofosfat, atunci scade activitatea transcetalozei.

Creşterea piruvemiei cu 20,8% ($p < 0{,}001$) şi a piruvuriei cu 23,3% ($p < 0{,}05$) care indică blocarea intrării piruvatului în ciclul oxidativ al acizilor tricarboxilici prin scăderea sistemelor enzimatice dependente de tiaminpirofosfat, vine în sprijinul unei deficienţe tiaminice la alcoolici. De asemenea acidul lactic, alt metabolit intermediar al acestui lanţ metabolic a crescut cu 71%.

Aşa cum au arătat numeroase cercetări, principalul defect metabolic produs de alcool la nivelul celulei hepatice este schimbarea stării redox prin schimbarea raportului $NADH_2/NAD$ în favoarea unei stări reduse (consecinţa oxidării etanolului în aldehida acetică, ce se asociază cu reducerea a 2 molecule NAD la $NADH_2$). Urmarea modificării raportului $NADH_2/NAD$ este tulburarea raportului lactat/piruvat care reflectă schimbarea potenţialului redox la nivelul ţesuturilor periferice. Faptul că în cercetarea noastră lactatul a crescut într-o proporţie mult mai mare decît piruvatul, raportul lactat/piruvat fiind cu 35% mai crescut la alcoolici faţă de grupul martor, indică pe lîngă o insuficienţă a enzimelor tiamino-dependente şi o schimbare a potenţialului redox la nivelul celulei hepatice. Deoarece multe sisteme enzimatice sînt dependente de raportul $NADH_2/NAD$, aceste schimbări la nivelul celulei hepatice lezate, afectează reacţiile cheie ale diverselor căi metabolice printre care şi reacţiile de metabolizare normală a tiaminei (8) (10).

Din anamneza alimentară reiese că la alcoolicii studiaţi de noi, hipotiaminoza nu se datoreşte unui aport neadecvat de vitamina B_1. Într-adevăr, majoritatea consumau produse cu un conţinut ridicat în vitamina B_1 (pîine neagră, intermediară, bere etc.) şi foarte puţine dulciuri care se ştie că atunci cînd sînt ingerate în cantitate mai mare măresc nevoia de vitamina B_1. Faptul că tiaminuria (care reflectă mai mult ingestia recentă de vitamină), nu a scăzut la alcoolici, arată un aport şi o absorbţie digestivă bună a tiaminei. Neconcordanţa cu ceilalţi indicatori care arată o insuficienţă tiaminică la nivelul organelor nu poate fi pusă decît pe seama alterării reacţiilor biochimice de la nivelul celulei hepatice, care determină fie inhibiţia fosforilării enzimatice a tiaminei, fie scăderea cantităţii de apoenzimă prin tulburarea funcţiei proteinoformatoare, reducînd în acest fel conversia vitaminei din aport, în forma sa activă din punct de vedere metabolic — tiaminpirofosfat.

Rezultatele cercetărilor noastre sînt în concordanţă cu studiile unor cercetători (3, 6, 12, 13) care au găsit că rezervele de tiamină din ţesuturi sînt mai scăzute cu cît modificările de la nivelul celulei hepatice sînt mai profunde.

O privire de ansamblu asupra indicatorilor pe care i-am folosit în testarea stării de nutriţie tiaminică la alcoolici, ne arată că sub acţiunea alcoolului unii au fost afectaţi într-un grad mai mare, alţii mai puţin.

De exemplu tiaminuria s-a menținut în limitele normale și de aceea folosirea numai a acestui indicator mai puțin sensibil în evaluarea stării de hipotiaminoză nu poate reflecta ansamblul modificărilor fiziopatologice din alcoolism. Pentru cunoașterea în profunzime a tulburării lanțurilor metabolice și mai ales a interrelațiilor dintre ele, urmărirea mai multor indicatori specifici, simultan și mai ales corelarea lor cu aportul exogen, se impune cu necesitate.

CONCLUZII

1. În evaluarea stării de hipovitaminoză se impune urmărirea simultană a mai multor indicatori specifici.
2. Deficitul de tiamină la alcoolici se datorește nu numai unui aport insuficient sau unei nevoi metabolice crescute, ci mai ales tulburărilor de metabolizare normală a vitaminei în celula hepatică lezată.

Prezentat la redacție
la 23 martie 1979

Institutul de Medicină și Farmacie — București
Catedra de Igienă

LES RÉPERCUSSIONS DE L'ABUS D'ALCOOL SUR L'ÉTAT DE NUTRITION THIAMINIQUE

RÉSUMÉ

On a fait des recherches sur l'état de nutrition thiaminique de 81 alcooliques, internés au Centre de désintoxication alcoolique C.U.L.A. et aux cliniques médicales C.F.R.$_2$ et Griviţa-Bucureşti. Les indicateurs biochimiques obtenus ont été comparés à ceux du groupe témoin.

La diminution significative de l'activité de la transcétolase érythrocytaire, ainsi que de l'élimination % de la quantité de vitamine B_1 injectée, indique, au niveau des organes, sous l'influence de l'alcool, une diminution de la thiamine disponible, celle qui est métaboliquement active. L'augmentation de la pyruvicémie, de la pyruvicurie et de la lactacidémie confirme, chez les alcooliques, la déficience thiaminique. L'augmentation du rapport lactate/pyruvate, qui reflète le changement du potentiel redox au niveau de la cellule hépatique, indique des troubles profonds des diverses voies métaboliques.

De l'anamnèse alimentaire ainsi que de l'excrétion de la thiamine par l'urine, il résulte que, chez les alcooliques étudiés, l'apport de vitamine B_1 a été normal et que la hypovitaminose thiaminique est due aux troubles de métabolisation normale de la vitamine B_1.

BIBLIOGRAFIE

1. M. Brin, N.Y., Acad. Sci., **98**, 528 (1962).
2. O. A. Forsander, Quart. J. Stud. Alcohol, **31**, 550 (1970).
3. O. A. Forsander, Biochem J., **98**, 244 (1966).

4. T. E. Friedemann, G. E. Haugen, J. Biol. Chem., **147**, 415 (1943).
5. I. Gonţea, V. Gorcea, E. Popescu, Nutr. Rep. Intern, **12**, 149 (1975).
6. C. I. Gubler, Int. Z. Vitaminforsch, **38**, 287 (1968).
7. B. Mauk, Practical Physiological Chemistry. **569**, (1949).
8. R. D. Hawkinss, H. Kalant, Pharmacol. Rev., **24**, 67 (1972).
9. G. E. Haugen, Scand. J. Clin. Invest., **12**, 253 (1960).
10. H. K. Kiessling, L. Pilstrom, Quart. J. Stud. Alcohol., **27**, 189 (1966).
11. M.K.G. Kiessling, Exp. Cell. Res., **19**, 628 (1960).
12. R. A. Kreisberg, W. C. Owen, A. M. Siegal, J. Chem. Endocrinol. and Metabol., **34**, 29 (1972).
13. J. R. Neville, J. A. Eagles, C. Samson, R. E. Olson, Amer J. Nutr., **21**, 1329 (1968).
14. P. A. Tamasulo, R. M. H. Kater, Amer. J. Clin. Nutr., **21**, 1341 (1968).

METODE DE DECELARE A SIgA ÎN MATERIILE FECALE

ELENA GANEA, CECILIA MOTAŞ

Rezumat. S-a elaborat o metodă de determinare a SIgA din fecale adaptînd metodele Fahey şi Mancini după cerinţele proprii laboratorului nostru şi îmbunătăţind condiţiile de difuzie şi vizualizare a SIgA în gel conţinînd antiseruri specifice. S-a realizat curba standard folosind 11S (SIgA) pentru determinări făcute concomitent cu serurile imune : anti-SP, anti-IgA seric şi anti-SIgA. S-au făcut de asemenea determinări cu seruri necaracteristice conţinutului intestinal ca antialbumină şi anti-IgG şi s-au discutat în funcţie de aceste rezultate valorile cantitative ale SIgA, în vederea creşterii specificităţii metodei.

Imunoglobulina A secretoare (SIgA) reprezintă principalul factor al sistemului de apărare locală la nivelul mucoaselor. Alte componente ale acestui sistem sînt lactoferina şi lizozimul.

SIgA este compusă din trei unităţi distincte, care împreună formează molecula imunoglobulinei 11S şi care sînt : IgA dimer, SC şi lanţul J(1). Numai că acest tip de moleculă, nu este singura formă de IgA găsită în secreţii, IgA monomer reprezintă aproximativ 20% din IgA din colostru (2), secreţia nazală (3) şi secreţia bronşică (4) şi aproximativ 33% din IgA secreţiei dudodenale şi jejunale (5). O parte din acest IgA monomer este cuplată şi ea cu SC (6). Aproximativ 20% din IgA din secreţii este compus şi din specii mai grele decît 11S SIgA şi se presupune că reprezintă, fie polimeri de 11S (avînd SC prezentă) (7), fie polimeri de IgA, la care este ataşată SC.

Ultracentrifugarea în gradient de densitate demonstrează heterogenitatea greutăţii moleculare a IgA în diferite secreţii (8).

Componenta secretoare (SC) liberă, a fost decelată întîi în secreţiile persoanelor deficiente în IgA (9), pentru ca să se constate ulterior că coexistă cu SIgA în colostrul uman normal (10), în lapte (11) şi toate celelalte secreţii, fiind prezentă şi în laptele de vacă şi denumită, „glicoprotein-a" (12).

Toate aceste componente, cu greutăţi moleculare heterogene, prezente în secreţii, fac ca acurateţea metodelor de determinare prin metoda Mancini (13) sau Fahey (14) să lase foarte mult de dorit. În aceste condiţii, se impune găsirea unei metode proprii laboratorului în care se face determinarea, cu folosirea unui standard de 11S (SIgA) şi cu determinări făcute concomitent cu mai multe antiseruri ca : anti-SP, anti-IgA seric şi anti-SIgA.

Pe de altă parte, indicaţia lui Kraft şi colab. (15) asupra reacţiei nespecifice cu antiseruri a secreţiilor, mai ales a secreţiilor intestinale, impune şi determinarea concomitentă cu un ser necaracteristic conţinutului intestinal, ca antialbumină sau anti IgA.

MATERIAL ŞI METODE

PREPARAREA ŞI PURIFICAREA SIgA

SIgA s-a obţinut prin metoda lui Mestecky şi colab. (16) din colostru uman degresat şi decazeinizat. Produsul rezultat după gel filtrare pe Sephadex G-200 şi cromatografie pe Sepharose 6B dă o singură linie de precipitare cu antiserul anti-SIgA.

PREPARAREA ŞI PURIFICAREA SP (PIESEI SECRETOARE)

SP s-a obţinut din lapte uman degresat şi decazeinizat folosind metoda lui Newcomb şi colab. (17) modificată după Mestecky şi colab. (16). Preparatul final dă o singură linie de precipitare cu antiserul specific.

PREPARAREA SERURILOR IMUNE ANTI-SIgA ŞI ANTI-SP

S-a realizat prin injectarea intradermică la iepuri a cîte 2 mg proteină în prezenţă de adjuvant Freund complet, de două ori, la interval de două săptămîni. La 10 zile după ultima injecţie se constată apariţia anticorpilor în ser.

PREGĂTIREA PROBELOR DE MATERII FECALE

În vederea extragerii SIgA din fecale s-a omogenizat cîte 1 g de probă cu 1 ml apă distilată într-un omogenizator Potter. S-a centrifugat 20 min la 4 000 r.p.m., supernatantul utilizîndu-se pentru identificarea şi dozarea SIgA.

Dubla difuzie radială în gel de agaroză 1% s-a realizat după Ouchterlony (18) folosind antiseruri anti-SIgA, anti-IgA seric, anti-albumină serică umană, anti-SP şi anti-IgG.

DETERMINAREA CANTITATIVĂ A SIgA

S-au utilizat metodele lui Mancini (13) şi Fahey (14) cu anumite modificări. Curba etalon s-a realizat cu SIgA purificat din colostru uman în concentraţii 0,1—10 mg/ml. Difuzia s-a făcut în agaroză 1% conţinînd anti-SIgA, anti-IgA şi anti-SP în proporţie 1/20 şi 1/40 (v/v ; antiser/gel).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În scopul stabilirii specificităţii reacţiei cu serul imun anti-SIgA, s-a efectuat reacţia de dublă difuzie radială a probelor faţă de următoarele antiseruri : anti-albumină serică umană, anti-IgG, anti-IgA seric, anti-SP şi anti-SIgA. În figurile 1, 2 şi 3 sînt ilustrate rezultatele obţinute pentru probele colectate de la 8 copii.

În figura 1 se observă că toate probele dau linii de precipitare cu anti-SIgA, linii ce dau identitate totală cu linia SIgA/anti-SIgA. Deci toate probele conţin SIgA. În plus toate probele dau o linie de precipitare suplimentară, datorită unui compus cu viteză de difuzie mai mare ce poate fi un fragment de SIgA obţinut prin degradarea acesteia sau poate fi vorba de o reacţie nespecifică cu anti-SIgA.

Cu anti-IgA seric (fig. 2) toate probele în afară de proba 8 dau reacţie specifică caracteristică SIgA, adică linia lor de precipitare prezintă identitate parţială cu linia IgA/anti-IgA. Aceste probe conţin deci SIgA. Proba 8 dă cu serul anti-IgA o linie de precipitare care arată o identitate totală cu linia IgA/anti-IgA. Deci proba 8 conţine IgA seric.

Pe lîngă linia datorată SIgA, probele 2, 4, 5 și 6 mai dau o linie de precipitare cu identitate totală față de linia IgA/anti-IgA. Deci aceste probe conțin și IgA seric datorită probabil procesului inflamator la nivelul mucoaselor.

Prezența IgA serice în probele menționate poate afecta exactitatea determinării cantitative a SIgA prin difuzia radială a probelor în gel conținînd anti-SIgA. IgA difuzînd mai repede decît SIgA datorită greutății moleculare mai mici, produce inele de difuzie cu diametre mai mari, ducînd la o supraestimare a valorilor SIgA. De asemenea în anumite cazuri (de exemplu proba 8) se poate ca inelul de precipitare să se datoreze în exclusivitate IgA seric, proba neconținînd SIgA.

Pentru aceste motive este necesară verificarea rezultatelor obținute cu anti-SIgA prin efectuarea dublei difuzii radiale față de anti-IgA seric.

În vederea depistării altor surse de erori s-a urmărit dubla difuzie radială și față de anti-IgG și anti-albumină.

Cu anti-IgG (fig. 1) probele 1, 2, 3, 4, 5 dau linii de precipitare ce dau reacție de neidentitate totală cu linia IgG/anti-IgG, probele 6 și 8 nedînd nici o linie de precipitare cu anti-IgG ; proba 5 prezentînd în plus o linie ce dă identitate parțială cu anti-IgG.

Reacția dată de probele 1, 2, 3, 4, 5 reprezintă linii de precipitare neimunologice între antiser și conținutul fecalelor așa cum au semnalat Kraft și colab. (15). IgG este realmente prezent doar în proba 5, după cum se vede din cea de a doua sa linie de precipitare.

Falsa reacție imună semnalată de Kraft și întîlnită de noi în cazul folosirii anti-IgG se evidențiază și cu serul anti-albumină serică umană (fig. 2). Astfel probele 1 și 3 dau cu anti-albumina linii de precipitare nespecifice deoarece aceste linii dau reacție de neidentitate totală cu linia de precipitare a albuminei cu antialbumina. Probele 2, 4, 5, 8 nu dau linii de precipitare cu antialbumina iar proba 6 conține pe lîngă SIgA și albumină deoarece ea dă o linie de precipitare ce prezintă identitate totală cu cea dată de albumină/anti-albumină.

Deci, din toate probele urmărite numai una conține IgG (probabil parțial scindat în intestin, linia de precipitare fiind parțial identică cu cea a IgG/anti-IgG) și tot numai una conține albumină. Prezența IgG și albuminei în fecalele copiilor, semnalată de Keller și Dwyer (19) ca sugerînd o degradare enzimatică mai mică a componentelor serice la nivelul intestinului, la copii, nu se confirmă la probele noastre.

În figura 3 sînt prezentate două probe (1 și 10) fiecare față de toate antiserurile menționate la „Material și metode". Se observă că proba 1 dă linii de precipitare cu anti-SIgA, anti-IgA și anti-SP, dovedind prezența SIgA în probe, dar și o linie nespecifică așa cum a rezultat și din figurile 1 și 2.

Proba 10 nu dă linie de precipitare cu albumina dar dă o linie cu anti-IgG neidentică cu celelalte. Din liniile de precipitare cu anti-SIgA, anti-IgA și anti-SP se vede că proba 10 conține SIgA.

Rezultatele reacțiilor de dublă difuzie descrise sînt prezentate în tabela 1.

Se observă că toate probele dau reacție cu anti-SIgA, la două probe (3 și 5) reacția fiind foarte slabă.

4 probe (2, 4, 6, 8) dau reacţia specifică cu antiserul pentru IgA monomer, serică.

O singură probă conţine IgG (proba 5) şi una singură (6) conţine albumină.

Tabela 1

Reacţii calitative la dubla difuzie cu seruri imune specifice şi valorile SIgA în fecale

Nr.	Pacient	SIgA	IgA	IgG	Albumina	Reacţie nespecif.		SIgA cantitativ
						a-IgG	a-albumina	
1	T.V.	+				+	+	0,2
2	B.G.	+	+			+	−	0,3
3	B.E.	slab				+	+	<0,1
4	I.N.	++	+			+	−	0,24
5	C.F.	slab		+		+	−	0,12
6	M.S.	+	+		+	−	−	0,47
8	S.St.	+	+			−	−	0,1
9	N.F.	+				+	+	0,17
10	B.I.	+				+	−	0,14

Falsa reacţie imună este dată cu serul anti-IgG de 7 probe (1, 2, 3 4, 5, 9, 10) şi cu anti-albumină de 3 probe (1, 3 şi 9).

Deoarece prezenţa liniilor neimunologice poate afecta exactitatea determinării SIgA, se impune aşadar , folosirea dublei difuzii radiale faţă de diverse seruri imune specifice în paralel cu imunodifuzia radială în gel conţinînd anti-SIgA.

DETERMINAREA CANTITATIVĂ A SIgA ÎN FECALE

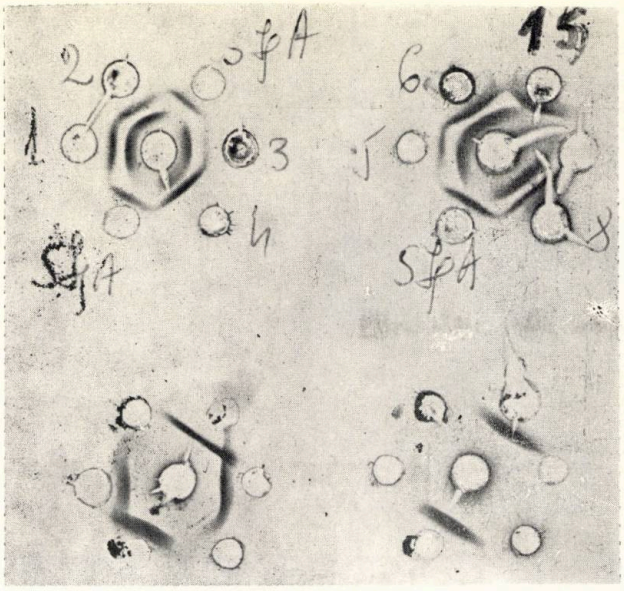
Deoarece între diferitele tehnici ce utilizează imunodifuzia radială există neconcordanţe datorate condiţiilor de lucru variabile (20) ne-am stabilit propriile noastre condiţii în ce priveşte concentraţia de antigen, antiser, timpul şi temperatura de migrare, etc.

Pentru determinarea curbei etalon s-au folosit concentraţii de antiser 1/10, 1/20, 1/40, 1/60. S-a observat că odată cu diluţia antiserului inelele de precipitare devin mai mari dar mai difuze. Ţinînd cont de aceasta şi de interesul folosirii unei cantităţi mici de antiser am ales concentraţia 1/20 ca optimă.

Imunodifuzia s-a urmărit în geluri de agaroză conţinînd atît a-SIgA cît şi a-IgA seric şi a-SP(Fig. 4). Se observă că antiserul a-SIgA şi a-SP formează cu antigenul inele de precipitare bine conturate în timp ce la a-IgA seric ele sînt mai difuze.

Curba etalon s-a obţinut prin reprezentarea pe ordonată a logaritmului concentraţiei de SIgA iar pe abscisă a diametrului inelului de precipitare în mm.

SIgA, avînd o greutate moleculară mare (390 000), migrarea sa în gelul conţinînd antiser este destul de mică; am observat că incubarea la o temperatură mai ridicată (30°C) creşte viteza de migrare. Aceasta concordă cu datele lui Khayam şi colab. (21) care incubează gelul 2—8 ore la 37°C.



Fi . 1. — Dubla difuzie radială a probelor de fecale (1, 2, 3, 4, 5, 6 și 8) față de serurile : anti-SIgA (sus) ; anti-IgG (jos) ; Între probele de fecale se intercalează SIgA, respectiv IgG.

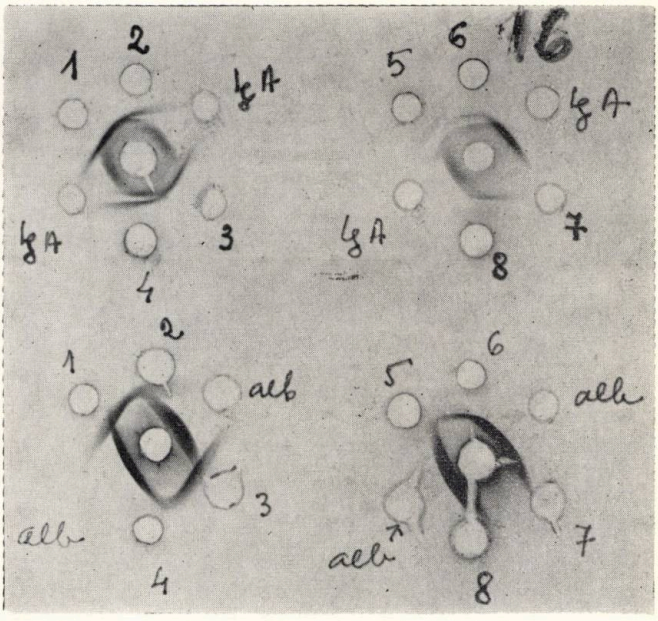


Fig. 2. — Dubla difuzie radială a probelor de fecale (aceleași din fig. 1) față de serurile imune : anti-IgA (sus) ; anti-albumină serică umană (jos) ; Între probele de fecale sînt intercalate IgA, respectiv albumină serică umană.

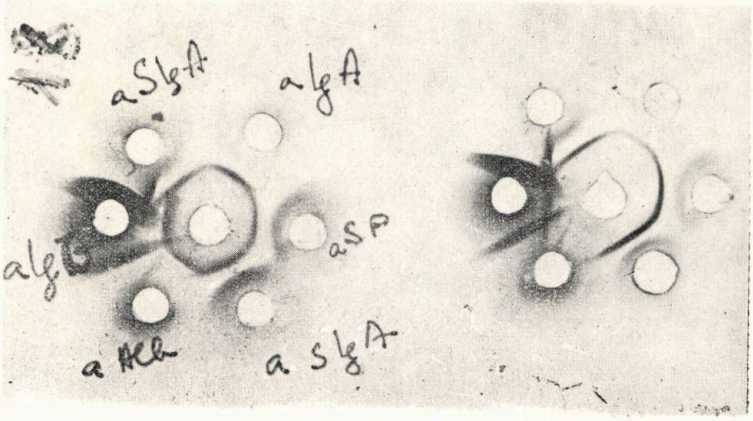
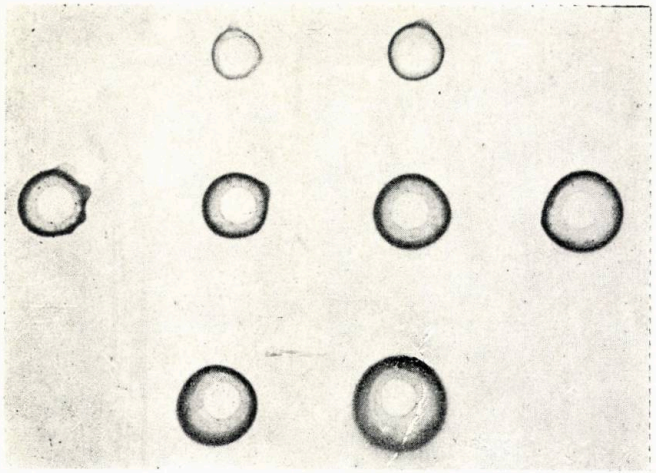
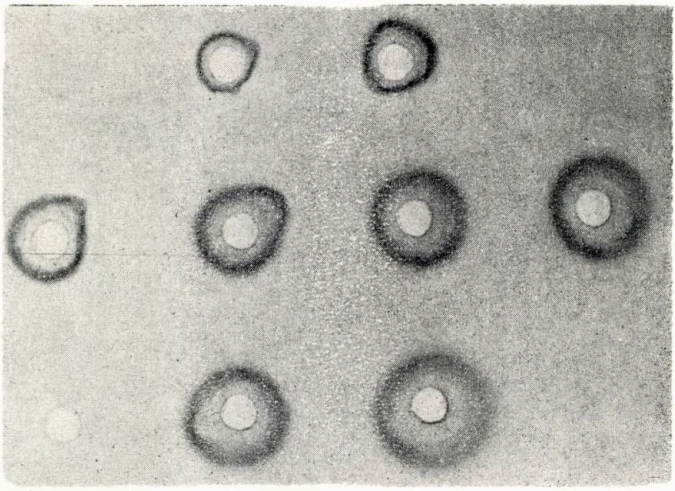


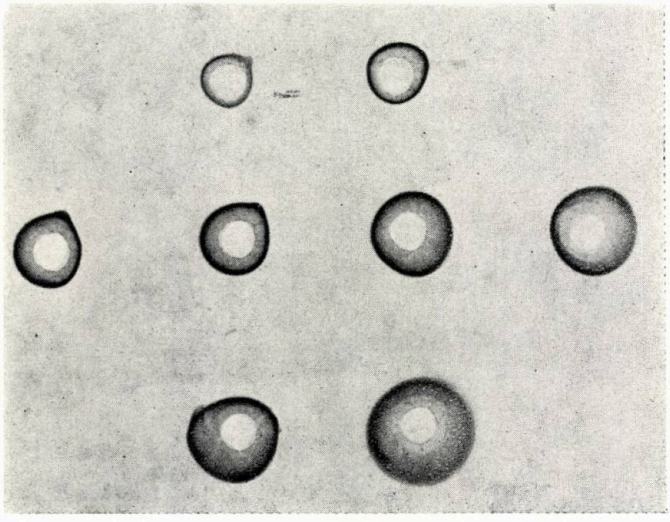
Fig. 3. — Dubla difuzie radială a două probe de fecale (1 și 10) față de serurile imune : anti-SIgA, anti-IgA, anti-SP, anti-albumină și anti IgG.



a



b



c

Fig. 4. — Imunodifuzia radială a SIgA de diferite concentrații în serurile imune : *a*) anti-SIgA ; *b*) anti-SP ; *c*) anti-IgA seric.

În acest mod pot fi evidențiate și concentrațiile mai mici care la temperatura camerei dau inele foarte apropiate de godeu.

Pentru soluția apoasă extrasă din materiile fecale s-au făcut de asemenea încercări pentru determinarea cantității optime necesare unei bune vizualizări a inelului de precipitare.

Așadar, plecînd de la metodele lui Mancini (13) și Fahey (14) și ținînd cont de cele discutate anterior, ne-am oprit final, la determinarea SIgA din materiile fecale, după următoarea schemă :

— Extracția cu apă a coproanticorpilor din fecale în raport 1 ml/1 g. În caz de neextracție se mărește raportul, ținînd seama la calcul de raportul modificat.

— Serul inclus în gel este în raport de 1/20.

— Difuzia se face la 37°C.

— Curba etalon se stabilește cu SIgA înalt purificat din colostru uman.

— Folosirea antiserurilor pentru SIgA, SP și IgA seric.

Cu ajutorul acestei metode, pentru probele analizate calitativ și prezentate anterior, s-au obținut rezultatele cuprinse în tabela I . Se constată că probele 3 și 5 care au prezentat la dubla difuzie radială linii de precipitare slabe cu anti-SIgA, au într-adevăr valori mici de SIgA și anume $< 0,1$ respectiv 0,12 mg/ml. Proba 4 care are 0,24 mg/ml SIgA a dat o puternică linie de precipitare cu anti-SIgA dar a prezentat și reacție specifică cu IgA seric. Deci s-ar putea ca valoarea SIgA din această probă să nu fie reală ci să se datoreze în parte și IgA seric. Într-un mod asemănător se poate interpreta și rezultatul cantitativ al probei 6. Interesantă este prezența IgG numai în cazul probei 5 care are o cantitate mică de SIgA (0,12 mg/ml).

În concluzie, estimarea cantitativă a SIgA în fecale fiind supusă unor variate surse de erori impune adaptarea unei metode proprii fiecărui laborator.

De asemenea din cele prezentate rezultă că în vederea interpretării corecte a datelor este necesar ca pe lîngă dozarea propriu-zisă (imunodifuzia în gel conținînd SIgA(să se efectueze și o serie de teste calitative cu antiserurile amintite în lucrare.

Prezentat la redacție
la 19 decembrie 1978

Institutul de Științe Biologice
Departamentul Biochimie
Laborator Proteine
Splaiul Independenței 296
București

METHODS FOR SIgA DETERMINATION IN FECES

SUMMARY

A method for SIgA determination in feces is described as a modification of Fahey and Mancini methods and the technical conditions were standardized for the use of our laboratory. The diffusion rate of SIgA in agarose containing specific antisera and the visualisation of ring pre-

cipitates were improved. 11S (SIgA) was used as standard and its diffusion in gel containing anti-SP, anti-IgA or anti-SIgA was tested. Unspecific antisera like anti-IgG and anti-albumin were used as well. The results are discussed with respect to these tests in order to increase sensitivity.

BIBLIOGRAFIE

1. J. F. Heremans, *Immunoglobulin A*, in *The Antigens*, ed. M. Sela, Academic Press, 1974, p. 365.
2. T. B. Tomasi, E. M. Tan, A. Solomon, R. A. Prendergast, J. Exp. Med., **121**, 101 (1965).
3. R. D. Rosen, R. H. Alford, W. T. Butler, W. E. Vannier, J. Immunol., **97**, 369 (1966).
4. R. W. Newcomb, B. L. DeVald, J. Lab. Clin. Med., **73**, 734 (1969).
5. D. M. Bull, T. B. Tomasi, Gastroenterology, **54**, 313 (1968).
6. J. Mestecky, F. W. Kraus, S. A. Voight, Immunology, **18**, 237 (1970).
7. P. Brandtzaeg, I. Fjellander, S. T. Gjeruldsen, Scand. J. Haematol., Suppl., **12**, 3 (1970).
8. D. R. Nash, J. P. Vaerman, H. Baziu, J. F. Heremans, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol, **37**, 167 (1970).
9. L. A. Hanson, B. G. Johansson, Gamma Globulins., Proc. Nobel. Symp., 3rd, 1967, 141.
10. R. W. Newcomb, D. Normansell, D. R. Stanworth, J. Immunol., **101**, 905 (1968).
11. P. J. J. Van Munster, G. B. A. Stoelinga, S. P. Oelszanders, Immunology, **17**, 165 (1969).
12. M. L. Groves, W. G. Gordon, Biochemistry, **6**, 2388 (1967).
13. C. Mancini, A. O. Carbonara, J. F. Heremans, Immunochem., **2**, 235 (1965).
14. J. L. Fahey, E. M. McKelvey, J. Immunol., **94**, 84 (1965).
15. S. C. Kraft, R. M. Rothberg, G. W. Kreibel, J. Immunol., **104**, 528 (1970).
16. J. Mestecky, R. Kulhavy, F. W. Kraus, J. Immunol., **108**, 738 (1972).
17. R. Newcomb, D. Normansell, D. R. Stanworth, J. Immunol., **101**, 905 (1968).
18. O. Ouchterlony, Acta Pathol. Microbiol. Scand., **26**, 516 (1949).
19. R. Keller, J. E. Droyer, J. Immunol., **101**, 192 (1968).
20. B. H. Berne, Immunochemistry, **9**, 1256 (1972).
21. H. Khayam-Bashi, S. Slaughter, R. M. Blanken, Clin. Chim. Acta, **66**, 63 (1976).

EFECTUL ROGORULUI (FOSFOTOX R) ASUPRA ACTIVITĂŢII PEROXIDAZEI PURIFICATE DIN HREAN (*ARMORACIA RUSTICANA*)

M. A. MATEESCU şi CLAUDIA-EVELINA BUDU

Rezumat. Rogorul prezintă un efect inhibitor asupra activităţii peroxidazei vegetale, care este în dependenţă liniară cu concentraţia sa în probă. Din reprezentarea grafică Lineweaver-Burk, a vitezelor de reacţie în funcţie de diferite concentraţii de substrat în absenţa şi respectiv în prezenţa inhibitorului, se constată o inhibiţie de tip incompetitiv. Efectul inhibitor este mai puternic la timpi mai mari de preincubare a enzimei cu pesticidul, care acţionează astfel ca un inhibitor necompetitiv. Prin corelarea datelor de mai sus, rezultă că rogorul prezintă o inhibiţie de tip mixt. Rogorul inhibă ireversibil peroxidaza imobilizată pe CM-agaroză. Sînt discutate posibilităţile de utilizare a sistemului peroxidazic în detectarea rogorului şi a altor compuşi toxici, în cadrul analizei calităţii apelor.

În contextul utilizării pe scară largă a diferitelor tipuri de pesticide, problema elucidării mecanismelor lor de acţiune, precum şi problemele legate de modificările produse de pesticide la nivelul anumitor etape ale proceselor metabolice la plante, sînt amplu abordate în literatura de specialitate din ultimii ani [1]. În acest cadru, problema interrelaţiilor între pesticide şi enzime este privită cu un deosebit interes, ele putînd furniza informaţii, uneori esenţiale, asupra mecanismelor biochimice de acţiune a pesticidelor. Plecînd de la efectul de inhibare a colinesterazelor de către pesticidele organo-fosforice, au început să fie din ce în ce mai mult utilizate sistemele enzimatice de analiză (sensori enzimatici), pe bază de colinesterază, pentru determinarea cantitativă a acestor pesticide [2]. Astfel, Varduca şi colab. [3] au elaborat şi caracterizat un sistem enzimatic de analiză a încărcării în pesticide organo-fosforice a apelor curgătoare, pe baza efectului inhibitor produs de aceste pesticide asupra colinesterazei.

În lucrarea de faţă ne-am propus punerea în evidenţă a efectelor produse „in vitro" de către pesticidele organo-fosforice asupra activităţii peroxidazei (donor : H_2O_2-oxidoreductaza, EC 1.11.1.7.) şi studiul posibilităţilor de determinare enzimatică a concentraţiilor de pesticide din diferite probe, pe baza efectului inhibitor pe care acestea îl produc asupra activităţii peroxidazei.

Ne-am oprit asupra rogorului, ditiofosfat de 0,0-dimetil-S-(N-metil carbamoil)-metil, deoarece este un pesticid organo-fosforic utilizat (insecticid şi acaricid sistemic, cu spectru larg de acţiune), [4] care prezintă avantajul că este solubil în mediu apos, şi care mai este cunoscut şi sub denumirile tehnice de dimetoat, fosfamid, fosfotox etc.

Problema influenței pesticidelor asupra activității peroxidazei vegetale a fost urmărită mai ales „in vivo" prin studiul diferențelor între activitățile peroxidazice la plante tratate și respectiv netratate, în diferite perioade ale evoluției acestora. Astfel, tratamente ale solului cu pesticide organo-mercurice, de tipul clorurii de etil-mercur (criptodin) [5] [6] și organo-clorurate (lindan, heptaclor [7], conduc la creșteri ale activității peroxidazei în unele organe și țesuturi, în diferite etape de vegetație ale plantelor.

Problema interacțiunii între peroxidază și pesticidele organo-fosforice a fost urmărită, însă sub aspectul rolului peroxidazei de a cataliza degradarea oxidativă a parationului, cu formare de produși mai puțin toxici [8].

MATERIAL ȘI METODE

Extracția și purificarea peroxidazei. Enzima a fost extrasă cu o soluție de tampon acid acetic-acetat 0,05 M, pH 4,7, din rădăcini de hrean mărunțite și mojarate. Purificarea enzimei a fost realizată prin precipitări fracționate cu sulfat de amoniu, în condițiile descrise de Shannon și colab. [9] și cromatografie pe Sephadex G-50 medium, în condiții descrise anterior [10].

Activitățile enzimatice au fost determinate prin metoda Brad și colab. [11] bazată pe oxidarea enzimatică a benzidinei în prezența apei oxigenate și a acidului ascorbic. Preparatul enzimatic utilizat în determinări, prezenta o activitate specifică de 480 μmoli ascorbat/min/mg proteină (factor de purificare 69) și o concentrație proteică de 3,3 mg proteină/ml.

Concentrațiile proteice au fost determinate prin metoda Lowry în cazul extractului proteic total [12] și prin metoda Warburg și Cristian [13] în cazul fracțiilor purificate.

Efectul concentrațiilor de rogor asupra activității peroxidazei a fost urmărit prin determinarea vitezelor de reacție enzimatică prin metoda Brad și colab. [11] parțial modificată, astfel încît în mediul de reacție s-au introdus cîte 0,1 ml soluție de peroxidază (după o prealabilă diluție de 10%), 1 ml soluție rogor în concentrații cuprinse între 0 și 1,8 mg/ml, restul reactivilor fiind cei utilizați în mod uzual în metodă.

Influența timpului de preincubare a enzimei cu rogor a fost urmărită în condițiile de mai sus, cu mențiunea că probele conținînd amestecul format din 0,1 ml soluție de enzimă și 1 ml soluție de rogor (0,3 mg/ml) au fost preincubate diferite perioade de timp cuprinse între 0 și 20 minute, după care în probe au fost introduse soluțiile de substrate pentru determinările de activități enzimatice.

Influența concentrațiilor de substrat asupra vitezelor de reacție enzimatică a fost urmărită în condițiile de mai sus, utilizîndu-se însă în probe cîte 1 ml soluție H_2O_2 în concentrații cuprinse între 0,2% (0,0586 M) și 5% (1,465 M). Determinările au fost efectuate în absența rogorului și respectiv în prezența unor concentrații de rogor de 0,6 mg/ml și 1,2 mg/ml. Reprezentarea grafică Lineweaver-Burk a permis aprecierea tipului de inhibiție.

Imobilizarea peroxidazei pe CM-agaroză reticulată în stare perlată (CM-agaroză-X-P) a fost realizată în condiții anterior descrise [14], prin tratarea a 5 ml gel depus de CM-agaroză-X-P cu 0,1 g de clorhidrat de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimidă (EDC), produs al firmei Merck, și cu 10 ml soluție de peroxidază. Suportul de CM-agaroză-X-P a fost realizat prin procedeul descris de Schell și colab. [15]. Peroxidaza imobilizată prezenta o activitate de 105 μmoli ascorbat oxidat/min/ml gel și o concentrație proteică de 3 mg proteină/ml gel.

Determinarea efectului produs de rogor asupra peroxidazei imobilizate a fost efectuată printr-o metodă spectrofotometrică [16], într-o instalație cu flux continuu, constituită dintr-o microcoloană (10 × 0,8 cm) ce conținea 2 ml gel depus de enzimă imobilizată, peste care au fost trecute soluții de substrate formate dintr-un amestec de volume egale de soluții de hidrochinonă 0,35 mg/ml și H_2O_2 0,05% și care conțineau concentrații de rogor cuprinse între 0 și 0,6 mg/ml. Instalația a fost prevăzută cu o pompă peristaltică, pentru realizarea unei viteze constante de eluție prin coloană. Citirile au fost efectuate conform metodei [16], la $\lambda = 250$ nm, martorul fiind constituit din aceleași soluții, dar care nu au fost trecute pe coloana enzimatică. După fiecare determinare, coloana a fost spălată pentru îndepărtarea totală a excesului de substrate, pesticid și produși de reacție adsorbiți pe suprafața particulelor de gel.

În toate determinările a fost utilizat produsul tehnic românesc Fosfotox R, care conține 35% substanță activă [4].

REZULTATE

Studiind efectul diferitelor concentrații de rogor asupra vitezelor de reacție enzimatică a fost constatată (fig. 1) o scădere liniară a vitezelor de reacție în funcție de creșterea concentrațiilor de pesticid introduse în probă. Astfel, s-a constatat o inhibiție de 18 % a activității enzimatice la o concentrație de rogor de 0,3 mg/ml și o inhibiție totală (100%) la concentrația de 1,8 mg/ml rogor.

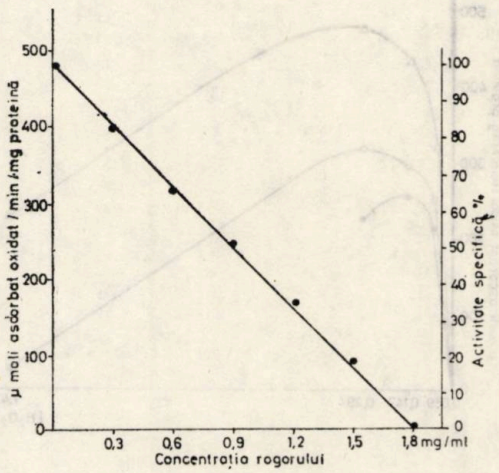


Fig. 1. — Influența concentrațiilor de rogor asupra activității peroxidazei.

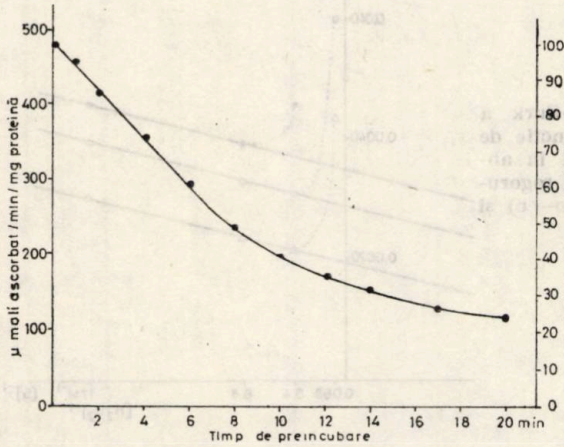


Fig. 2. — Influența timpului de preincubare a enzimei cu rogor asupra activității enzimatice.

Urmărind influența timpului de preincubare a enzimei cu rogor, s-a constatat o scădere liniară, marcată, a vitezelor de reacție pe parcursul primelor 8 minute de preincubare (fig. 2), ajungînd pînă la o inhibiție de 50% a activității enzimatice, urmînd ca la timpi mai mari de preincubare (20 minute) să se ajungă la o inhibiție de 80%. Se observă deci

că rogorul prezintă un efect inhibitor destul de puternic, care se produce în mod special pe parcursul primelor minute de contact între enzimă și inhibitor.

Influența concentrațiilor de substrat asupra vitezelor de reacție la diferite concentrații de inhibitor și reprezentările grafice ale valorilor obținute, conform ecuațiilor Michaelis-Menten și Lineweaver-Burk, sînt prezentate în figura 3 și figura 4. Din reprezentarea grafică a funcțiilor

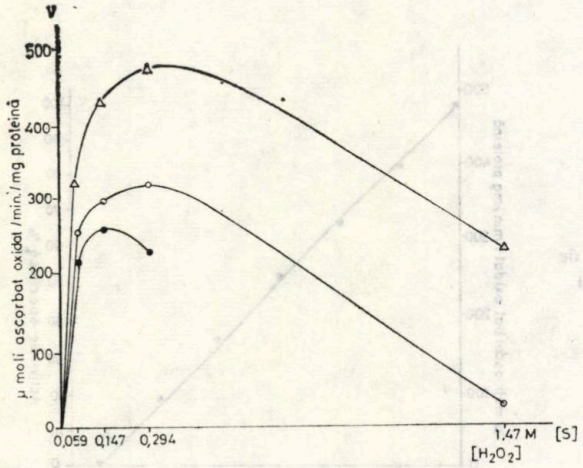


Fig. 3. — Influența concentrațiilor de substrat asupra vitezelor de reacție enzimatică în absența (Δ—Δ) și respectiv în prezența rogorului în concentrații de 0,6 mg/ml (o—o) și 1,2 mg/ml (●—●).

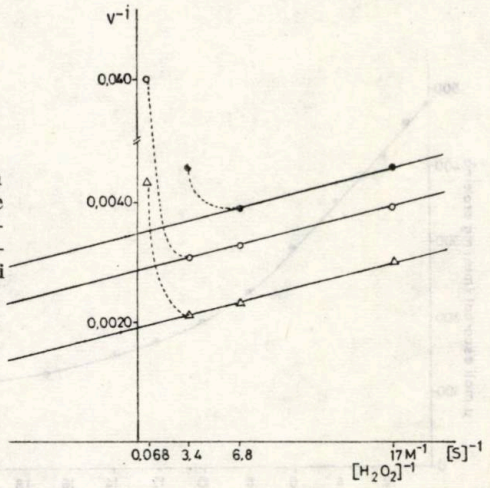


Fig. 4. — Reprezentarea Lineweaver-Burk a reciprocelor vitezelor de reacție în funcție de reciprocele concentrațiilor de substrat în absența (Δ—Δ) și respectiv în prezența rogorului în concentrații de 0,6 mg/ml (o—o) și 1,2 mg/ml (●—●).

$v^{-1} = f[S]^{-1}$, conform ecuației Lineweaver-Burk (fig. 4), se poate trage concluzia că rogorul ar produce o inhibiție de tip incompetitiv. Se constată totodată că și în prezența rogorului peroxidaza prezintă cunoscutul efect de inhibiție la concentrații ridicate de substrat.

Influența diferitelor concentrații de rogor asupra peroxidazei imobilizate este prezentată în figura 5. Se constată că și în cazul enzimei

imobilizate, la concentrații crescînde de rogor apare același efect de scădere liniară a activităților enzimatice. Urmărind însă posibilitățile de utilizare repetată, în flux continuu, a peroxidazei imobilizate în vederea

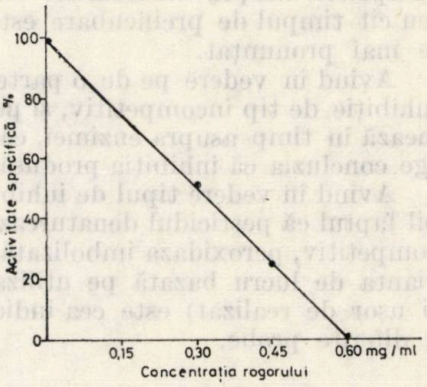


Fig. 5. — Influența concentrațiilor de rogor asupra activității peroxidazei imobilizate pe CM-agaroză.

detecției pesticidelor organo-fosforice (sensor enzimatic), s-a constatat că după un număr redus de determinări, enzima își pierde treptat activitatea, chiar și după spălarea cu diferite soluții tampon a urmelor de pesticid adsorbit pe coloană.

DISCUȚII

Din datele prezentate rezultă că rogorul prezintă un efect relativ puternic de inhibiție a peroxidazei. Avînd în vedere dependența liniară între activitatea enzimatică și concentrațiile de pesticid din probe (fig. 1), apare posibilă utilizarea acestui sistem enzimatic la determinarea cantitativă a rogorului prezent în probe. Limita de detecție a rogorului în sistemul propus (0.09 mg/ml) este cu puțin mai mare decît cea constatată în cazul utilizării sistemului enzimatic pe bază de colinesterază (0,05 mg/ml) [17]. Sistemul de detecție a pesticidelor organo-fosforice pe bază de colinesterază prezintă însă avantajul unei selectivități ridicate, în sensul că alți agenți toxici (exemplu pesticidele organo-clorurate) nu prezintă efecte inhibitorii marcate [18]. Pe de altă parte, faptul că peroxidaza este puternic inhibată atît de pesticidele organo-fosforice, așa cum s-a arătat, cît și de cele organo-clorurate[18] și de ionii CN^-, poate fi considerat ca un avantaj, în sensul că sistemul peroxidazic este sensibil la o gamă variată de agenți toxici. Această comportare deschide deci perspectiva utilizării peroxidazei (enzimă larg accesibilă) în analiza calității apelor, ca un factor de alarmare la prezența compușilor toxici din ape. Cantitățile de enzimă necesare pentru o analiză în sistemul descris sînt de ordinul a 10^{-2} mg/probă, iar adaptarea unor metode cinetice de analiză (ex. metoda [16]) creează posibilități de automatizare a procesului.

Din datele obținute la studiul cineticii de reacție enzimatică în prezența și respectiv absența inhibitorului (fig. 3 și 4) ar rezulta că rogorul

ar produce o inhibiție de tip incompetitiv, deci că inhibitorul ar prezenta afinitate pentru complexul enzimă-substrat [19]. Or, din datele obținute la studiul influenței timpului de preincubare a enzimei cu rogor, în absența substratelor, reiese că rogorul acționează în timp (fig. 2) ca un inhibitor necompetitiv asupra structurilor superioare ale enzimei, constatîndu-se că cu cît timpul de preincubare este mai mare, cu atît efectul inhibitor este mai pronunțat.

Avînd în vedere pe de o parte faptul că din studiul cinetic apare o inhibiție de tip incompetitiv, și pe de altă parte faptul că rogorul acționează în timp asupra enzimei, ca un inhibitor necompetitiv, se poate trage concluzia că inhibiția produsă de rogor este de tip mixt.

Avînd în vedere tipul de inhibiție mixt, produs de rogor, apare explicabil faptul că pesticidul denaturează în mod ireversibil, ca orice inhibitor necompetitiv, peroxidaza imbolizată pe CM-agaroză. Din acest motiv varianta de lucru bazată pe utilizarea enzimei libere (mai economică și mai ușor de realizat) este cea indicată pentru determinările de pesticid din diferite probe.

Prezentat la redacție
la 5 iunie 1979

Institutul de Științe Biologice
București

THE INFLUENCE OF ROGOR (DIMETHOATE) ON THE PURIFIED HORSE RADISH PEROXIDASE

SUMMARY

Rogor (dimethoate) has an inhibitory effect on the activity of horse radish peroxidase, in linear dependence with its concentration in the samples. From Lineweaver-Burk plots, the inhibition appears to be uncompetitive. The inhibitory effect is stronger at longer preincubation time of enzyme with the pesticide that acts as a non-competitive inhibitor. From the above data, rogor presents an inhibition of a mixed type. Rogor irreversibly inhibits the peroxidase immobilized on CM-agarose. The possibilities to use the peroxidase system in detecting rogor and other toxic compounds, in the analysis of the quality of waters, are discussed.

BIBLIOGRAFIE

1. J. R. Corbett, *The biochemical mode of action of pesticides*, Acad. Press, N.Y., 1974.
2. G. G. Guilbault, *Enzymatic methods of analysis*. International series of monographs in analytical chemistry, Pergamon Press, New-York, Vol. 14, 1970.
3. A. Varduca, C. Luca, D. Virtosu, Rev. chim., **27**, 350 (1976).
4. T. Baicu, A. V. Alexandri, *Îndrumător pentru folosirea pesticidelor*, Ed. Ceres, București, 1973, p. 126.
5. A. Ștefan, D. Ionescu, Analele Universității București, seria Biologie vegetală, **XIX**, p. 149, 1970.
6. A. Ștefan, D. Ionescu, Analele Universității București, seria Biologie vegetală, **XVIII**, p. 149, 1969.

7. I. HAGIMA, Teză de doctorat, Univ. București, Fac. Biologie, 1975.
8. J. B. KNAAK, M. A. STAHMANN, J. E. CASIDA, Agr. and Food. Chem., **10**, 154 (1962).
9. L. M. SHANNON, E. KAY, J. L. LEW, J. Biol. Chem., **241**, 2166 (1966).
10. M. DUMITRESCU, H. D. SCHELL, M. A. MATEESCU, St. cerc. biochim., **19**, 33 (1976).
11. I. BRAD, G. OLTEANU, Z. MARCU, St. cerc. biochim., **12**, 323 (1969).
12. O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, L. A. FARR, R. J. RANDALL, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1952).
13. O. WARBURG, C. H. CRISTIAN, Biochem. Z., **310**, 384 (1941).
14. H. D. SCHELL, M. A. MATEESCU, Acta Biol. Med. Germ., **34**, 954 (1975).
15. H. D. SCHELL, T. BENȚIA, M. A. MATEESCU, Brevet de invenție nr. 65382/1977, O.S.I.M., R. S. România.
16. M. A. MATEESCU, H. D. SCHELL, C. BUDU, Rev. roum. biochim., **16**, 115 (1979).
17. A. VARDUCA, Teză de doctorat, Inst. Politehnic București, Fac. Chimie, 1975.
18. H. D. SCHELL, M. A. MATEESCU, I. CORNOIU, T. BENȚIA, St. cerc. biochim., **20**, 223 (1977).
19. I. F. DUMITRU, D. IORDĂCHESCU, *Enzime*, ed. Medicală, București, 1974.

ROLUL PĂRŢII GLUCIDICE ÎN DEGRADAREA INTRACELULARĂ A PROTEINELOR. VIII. DEGRADAREA IgM CU CATEPSINA B_1 UMANĂ ÎN PREZENŢA ŞI ABSENŢA UNUI AMESTEC GLICOZIDAZIC DIN *STREPTOMYCES GRISEUS*

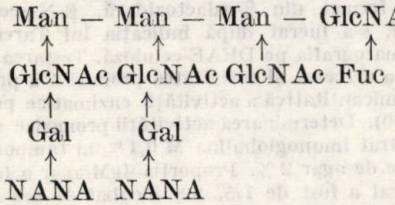
CORINA MIHAIL, CECILIA MOTAŞ

Rezumat. IgM a fost parţial deglucidizată prin acţiunea unui amestec glicozidazic din *Streptomyces griseus*, în prezenţa şi absenţa β-mercaptoetanolului (βME) ca agent reducător, în raport cu martorul (IgM netratată cu amestec glicozidazic şi IgM numai în prezenţa βME). Hidroliza ulterioară a fost realizată cu catepsină B_1 din ficat uman, activată în prealabil cu ditiotreitol (DTT) în raport cu martorul (în prezenţa şi absenţa amestecului glicozidazic comparativ cu IgM netratată). S-a determinat şi acţiunea pronazei presupusă a fi prezentă în preparatul glicozidazic. Modificările obţinute s-au urmărit prin dublă difuzie radială, imunoelectroforeză, gel filtrare, disc electroforeză în gel de poliacrilamidă în mediu alcalin cu sodiu dodecil sulfat (SDS) în prezenţă de uree. Rezultatele obţinute indică prezenţa pronazei în preparatul glicozidazic. Se obţin fragmente Fcμ şi Fabμ şi un compus intermediar presupus a fi cel de-al treilea lanţ L al IgM_s. Catepsina B_1 umană dă fragmente Fab şi IgM neatacată.

IgM este imunoglobulina cu cea mai mare proporţie de glucide în moleculă, a căror structură şi ataşare la fragmentele moleculei sînt cunoscute. Astfel se ştie că glucidele IgM sunt localizate pe lanţul H care conţine 5 unităţi oligozaharidice (1). Cercetările lui Johnson şi Clamp (2), confirmate ulterior de Hurst şi colab. (3), au arătat că cele 5 oligozaharide sunt formate din 3 unităţi complexe ataşate de fragmentul Fd, în regiunea balama şi respectiv pe fragmentul Fc şi 2 unităţi simple, prezente pe fragmentul Fc, spre capătul C terminal. Unităţile oligozaharidice de pe lanţurile polipeptidice ale imunoglobulinelor au fost clasificate în mod artificial în unităţi simple, formate din 3—5 monozaharide dispuse linear şi unităţi complexe, formate din numeroase monozaharide dispuse în structuri catenare înalt ramificate (4).

Redăm cele două tipuri de unităţi oligozaharidice :

a) Man — Man — Man — GlcNac — GlcNac — Asp
Unitate oligozaharidică simplă.

b)


Unitate oligozaharidică complexă.

Amestecul glicozidazic obținut din mediul de cultură al *Diplococcus pneumoniae* scindează din unitățile complexe, acid sialic terminal prin acțiunea neuraminidazei, β-galactozidul imediat următor prin acțiunea β-galactozidazei, iar N-acetilglucozamina, fie prin acțiunea succesivă a exo-N-acetilglucozaminidazei, fie prin acțiunea endo-N-acetilglucozaminidazei specifică amestecului glicozidazic din *Diplococcus pneumoniae* (5) (6) (7).

Dar, în apropiere de puntea disulfidică intersubunități monomere (8) (9) (10) (11) (12) se găsesc și unități simple (13). Aceste unități nu sînt hidrolizate de amestecul glicozidazic din *Diplococcus pneumoniae* (14), ci de alt amestec glicozidazic, obținut din mediul de cultură de la *Streptomyces griseus*, care conține endo-β-N-acetilglucozaminidază (15).

Deoarece IgM a fost degradată cu enzime proteolitice în fragmente Fabμ și $(Fab')_2$ μ de către tripsină (16) (17), chimotripsină (18), pepsină (19) și papaină (18) (20) și în unele condiții speciale, în fragment Fc, sau fragment $(Fc)_5$ μ cu tripsină la 60°C (17) (21((22) sau cu papaină, obținîndu-se însă, în acest caz, cantități foarte reduse (16) (19) (20), ne-am propus să studiem rolul părții glucidice în modul de degradare a acestei imunoglobuline pentamere.

Am lucrat, ca enzimă proteolitică, cu catepsina B_1 din ficat, deoarece s-a constatat că este una dintre cele mai principale enzime din sistemul cateptic intracelular (23) (24). În felul acesta, putem sesiza relația sistem glicozidazic/sistem cateptic în succesiunea degradării intracelulare a IgM.

În plus, am înțeles să studiem rolul părții glucidice în procesul de degradare, deoarece s-a arătat că acest proces este controlat de fragmentul Fc (25)(26), fragment care este purtătorul celor mai multe unități oligozaharidice.

MATERIAL ȘI METODE

Obținerea imunoglobulinei M. Imunoglobulina M a fost izolată din plasma unui pacient cu macroglobulinemie Waldenström după indicația lui Bennett(27). Precipitatul imunologic a fost obținut prin precipitarea cu de 15 ori volumul ei, prin picurare de apă distilată rece. Precipitatul format, lăsat la rece peste noapte, s-a centrifugat la 5000 rpm. Sedimentul s-a reluat în tampon Tris/HCl 5.10^{-2} M, pH = 8, ce conținea EDTA 2.10^{-3} M și NaCl 2.10^{-1}M și s-a reprecipitat în aceleași condiții. Precipitatul s-a resuspendat într-o cantitate minimă de tampon Tris/HCl 5.10^{-2}M, pH = 8,0. Purificarea s-a continuat prin gel filtrare pe Sepharoză 6B, pe o coloană de 2,3 × 95 cm, echilibrată în același tampon. S-au obținut două piscuri a căror porțiuni hașurate s-au concentrat și liofilizat.

Separarea și purificarea parțială a amestecului glicozidazic din Streptomyces griseus. În vederea obținerii unui amestec glicozidazic format din β-galactozidază, β-N-acetilglucozaminidază, neuraminidază și glucozaminidază, s-a lucrat după indicația lui Tarentino (15). Ne-am oprit după etapa a treia, adică la cromatografia pe DEAE-celuloză. Testarea activității s-a făcut pe glicopeptidul albuminic (28). S-a cercetat și activitatea pronazică a preparatului glicozidazic folosind metoda de determinare semicantitativă a activității enzimatice prin difuzia radială în geluri (29) modificată de Mușolan (30). Determinarea activității pronazice a preparatului glucozidazic s-a făcut folosind ca substrat imunoglobulina M 0,1 % în tampon citrat — — fosfat 0,2 M pH 5,5 înglobată într-o soluție de agar 2 %. Proporția IgM/agar a fost de 1/1. Raportul enzimă (amestec glicozidazic)/substrat a fost de 1/5. S-a incubat 48 ore la 37°C în camera umedă. La proba martor s-a folosit ca substrat cazeină (Hammersten) 0,1 % (29) (30). În paralel s-a făcut o curbă etalon cu concentrații cunoscute de pronază (Pronase P from Streptomyces griseus 45 000 PUK units Ig, Lyophil) față de care s-au făcut măsurătorile suprafețelor halourilor.

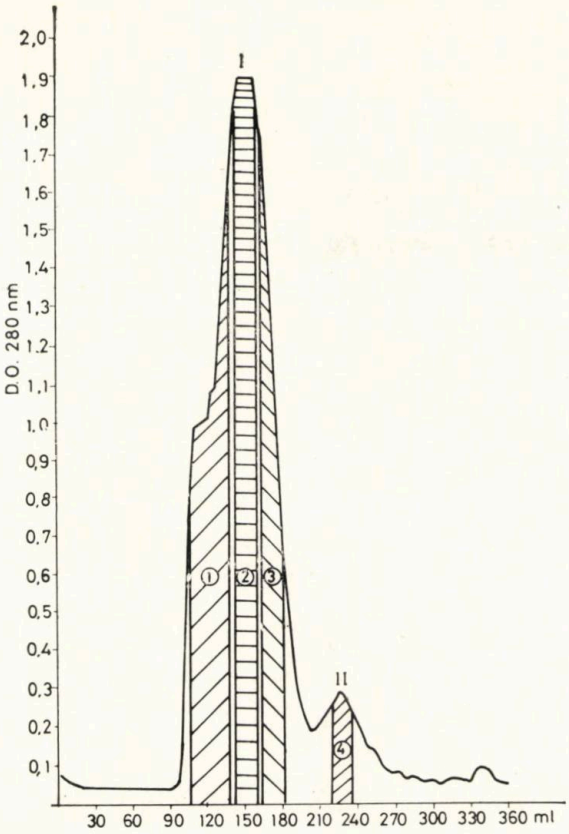


Fig. 1. — Gel filtrarea pe Sepharoză 6B în tampon TRIS/HCl 5.10^{-2} M, pH 8,0 ce conține EDTA 2.10^{-3} M și NaCl 2.10^{-1}M a imunoglobulinei M obținută prin precipitări repetate cu apă distilată rece, din plasma unui pacient cu macroglobulinemie Waldenström. Porțiunile hașurate s-au comasat, concentrat și s-au liofilizat.

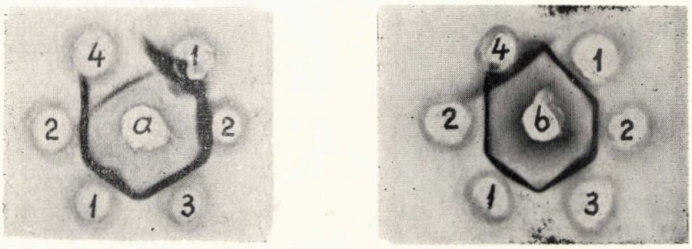


Fig. 2. — Dubla difuzie radială a piscurilor și a porțiunilor hașurate obținute prin gel filtrarea pe Sepharoză 6B. S-a folosit ser monospecific anti-IgM și anti ser total.
1 = porțiunea ascendentă a piscului I; *2* = porțiunea centrală a piscului I; *3* = porțiunea descendentă a piscului I; *4* — porțiunea hașurată a piscului II; *a* = ser anti-IgM, b = anti-ser total.

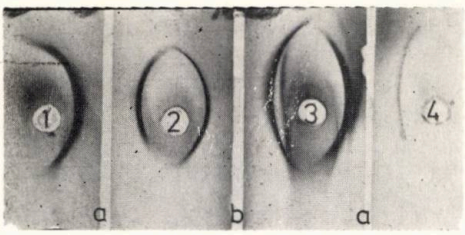


Fig. 3. — Imunoelectroforeza piscurilor obținute prin gel filtrarea pe Sepharoză 6 B.
1, 2, 3, 4, a, b, aceleași indicații ca în figura 2.

Separarea și purificarea parțială a amestecului de catepsine din extractul de ficat uman s-a făcut după metoda lui Barrett (31) (32).

Acțiunea glicozidazelor asupra IgM s-a efectuat în raport de 1/10 în tampon citrat 0,1 M pH 5,6 ce conține β-mercaptoetanol (βME) 0,1 M și în același tampon fără βME. Probele s-au incubat 24 și respectiv 48 ore la 37°C în prezență de toluen, la fel și probele folosite ca martori.

Gel filtrarea pe Sephadex G-100. S-a folosit o coloană de Sephadex G-100 (1,2 × 90 cm) echilibrată cu o soluție de bicarbonat de amoniu 5.10^{-2}M pH 7,5 (33). Profilul proteic s-a realizat prin citirea extincției la 280 nm, iar glucidele s-au determinat după metoda Dubois (34).

Dubla difuzie radială s-a făcut folosind un gel de agaroză 1% în ser fiziologic; pentru determinarea acțiunii pronazei s-a folosit un gel de agar 2% în apă distilată, care avea înglobat substratul în concentrație de 0,1%.

Acțiunea cateptică s-a determinat în tampon fosfat 0,1 M pH 6,0 în raport de 1/10. Preparatul cateptic s-a tratat în prealabil cu ditiotreitol (DDT) 1.10^{-3} M și cu EDTA 2.10^{-3} M, s-a incubat 1 oră la 37°C și s-a gel filtrat pe o coloană de Sephadex G-25 (1 × 33 cm) echilibrată în tampon fosfat 0,1 M pH 6,0 (20). S-a folosit fracțiunea de 2 ml care indică cea mai mare extincție la 280 nm. Preparatul cateptic astfel activat, se adaugă peste IgM în raport de 1/10 în prezență de EDTA 1.10^{-3} M. În paralel s-a testat și acțiunea preparatului glicozidazic după o dializă de două zile față de tampon citrat 0,1 M pH 5,6 în raport de 1/5. Incubarea s-a făcut timp de cinci zile la 37°C cu azidă pentru preparatul glicozidazic și apoi timp de încă două zile cu preparatul cateptic (35). Ca probă martor s-a folosit IgM incubată numai cu tampon.

Imunoelectroforeza s-a făcut în gel de agaroză 1% în tampon veronal pH 8,6 μ 0,05 diluat 1/3 în plăci, la 200 V, 30 mA, timp de trei ore. S-a folosit ser monospecific anti-IgM și anti ser total.

Disc electroforeza la pH alcalin cu sodiu dodecil sulfat (SDS) în prezență de uree s-a realizat în gel de poliacrilamidă după Kleine și colab (36).

REZULTATE

Purificarea imunoglobulinei M a dat un profil cromatografic format din două piscuri (figura 1). Piscul I majoritar, s-a împărțit în trei porțiuni hașurate, care s-au comasat separat, s-au concentrat prin perevaporare și s-au liofilizat. Din piscul II s-a comasat și liofilizat porțiunea hașurată. Puritatea fiecărei porțiuni s-a testat separat prin dublă difuzie (figura 2). Porțiunea ascendentă a curbei, notată cu *1*, ca și porțiunea descendentă notată cu *3* nu au indicat o puritate satisfăcătoare cum a fost cazul cu porțiunea centrală notată cu *2*, motiv pentru care toate determinările ulterioare s-au făcut numai pe porțiunea *2*. În cazul piscului II, porțiunea hașurată, notată cu *4*, a dat reacție cu serul monospecific anti-IgM, dar a indicat existența unui preparat cu greutate moleculară mult mai mică, probabil un monomer al IgM. Cu antiser total reacția a fost deosebit de slabă. Pentru aceleași probe s-a efectuat și imunoelectroforeza (figura 3).

Separarea și purificarea parțială a amestecului glicozidazic din Streptomyces griseus. Preparatul de amestec glicozidazic din *Streptomyces griseus* a fost o șarjă obținută de la Institutul chimico-farmaceutic, preparată în lunile iulie—august. Creșterea bacteriei impune 30°C, ceea ce este foarte dificil de menținut constant șase zile în lunile de vară. De aceea preparatul nostru este impurificat cu pronaze, enzime proteolitice eliberate de *Streptomyces griseus* în mediul de cultură. Nu am găsit modul lor de purificare ca să putem determina etapa în care am cuprins-o în preparatul glicozidazic. O șarjă obținută în luna decembrie, nu a prezentat această impurificare. Testările asupra preparatului glicozidazic referi-

toare la existența pronazei, au estimat, în condițiile noastre de lucru, o cantitate de 100 μg/ml pronază în preparatul studiat.

Determinarea acțiunii glicozidazelor s-a urmărit prin eliberarea glucidelor după o incubare de 24 și respectiv 48 ore, paralel cu rezultatele gel filtrării pe Sephadex G-100. S-au efectuat șase variante și anume :

1. IgM incubată cu βME și preparat glicozidazic.
2. IgM incubată fără βME în prezența preparatului glicozidazic.
3. IgM incubată cu tampon.
4. Enzima incubată numai cu tampon fără βME.
5. Enzima incubată cu tampon și cu βME.
6. IgM incubată numai cu βME.

Toate probele au fost efectuate în aceleași volume și în aceleași cantități de reactanți.

Rezultatele sunt arătate în tabela 1 și figura 4.

Tabela 1

Evidențierea eliberării glucidelor ca urmare a acțiunii preparatului glicozidazic asupra IgM după o incubare de 24, respectiv 48 ore

Nr. crt.	Proba analizată	Perioada de incubare (extincția la 480 nm)	
		24 ore	48 ore
1	IgM + βME + preparat glicozidazic	0,180	0,305
2	IgM − βME + preparat glicozidazic	0,100	0,170
3	IgM − βME − preparat glicozidazic	0,025	0,050
4	Preparat glicozidazic în tampon − βME	0,085	0,085
5	Preparat glicozidazic în tampon + βME	0,140	0,140
6	IgM + βME − preparat glicozidazic	0,110	0,095

Preparatul de IgM pus în prezența preparatului glicozidazic și a agentului reducător a indicat o eliberare de glucide mult mai crescută după o acțiune de 48 ore față de acțiunea de 24 ore (tabela I, 1). Gel filtrarea indică existența a două piscuri cromatografice în cazul unei incubări de 24 ore (figura 4 *a*) ; după o incubare de 48 ore piscul majoritar II rămîne practic neschimbat (figura 4 *b*), pe cînd profilul glucidic este mult micșorat ca arie față de incubarea de 24 ore (figura 4 *a* și *b*). În cazul acțiunii preparatului glicozidazic în absența reducătorului se observă că profilul proteic este considerabil schimbat față de cel obținut în prezența β ME (figura 4 *c* și *d*) și anume se observă că piscul proteic se eluează în

void volumul coloanei, atît în cazul incubării scurte cît și în cazul incubării prelungite. Ceea ce diferă în acest din urmă caz este profilul glucidic. În cazul incubării de 24 ore se evidențiază mai multe piscuri, notate *1*, *2*, *3*, pe cînd în cazul incubării de 48 ore glucidele practic nu sînt puse în evidență. Tabela 1 indică o eliberare de glucide mai pronunțată în cazul incubării de 48 ore (tabela 1, 2), atingînd aproape valoarea celei eliberate la 24 ore sub acțiunea β ME (tabela 1, 1). În cazul IgM incubată numai cu tampon, deoarece s-au obținut valori foarte scăzute la eliberarea glucidelor, evidențiate în tabela 1, 3, s-a determinat profilul proteic și glucidic numai pentru acțiunea de 48 ore (figura 4 *e*.) Profilul proteic rămîne neschimbat, se eluează tot în void volum ca și în cazul IgM incubată cu preparatul glicozidazic în absența β ME. Profilul glucidic are un aspect schimbat, se evidențiază două piscuri, dar se observă că și în acest caz primele două piscuri se eluează în același volum cu cele din figura 4 *c*, numai că prezintă valori mult mai mici (figura 4*e*), În cazul preparatului glicozidazic incubat numai cu tampon, nu se obțin diferențe în eliberarea glucidelor (tabela 1, 4). Gel filtrarea ne indică existența piscului proteic eluat tot în void volum (figura 4 *f*) de valoare mai redusă, pe cînd existența glucidelor nu poate fi pusă în evidență. Preparatul glicozidazic în prezența βME indică o creștere a eliberării glucidelor (tabela 1, 5), constatată în cazul ambilor timpi de incubare, iar profilul cromatografic prezintă un aspect schimbat. Piscul proteic, considerabil micșorat, se eluează în același loc cu cel obținut de acțiunea preparatului glicozidazic asupra IgM în prezența β ME (figura 4 *g*) profilul glucidic este și el modificat, piscul cu valoarea cea mai mare fiind deplasat de această dată între piscul I și II din figura 4 *c* și *e*. În cazul IgM incubată în tampon în prezența β ME timp de 48 ore se constată că eliberarea glucidelor prezintă valori oarecum asemănătoare cu cele obținute în cazul incubării preparatului glicozidazic în tampon (tabela 1, 6). Profilul cromatografic indică o valoare foarte scăzută a piscului proteic (figur 4 *h*).

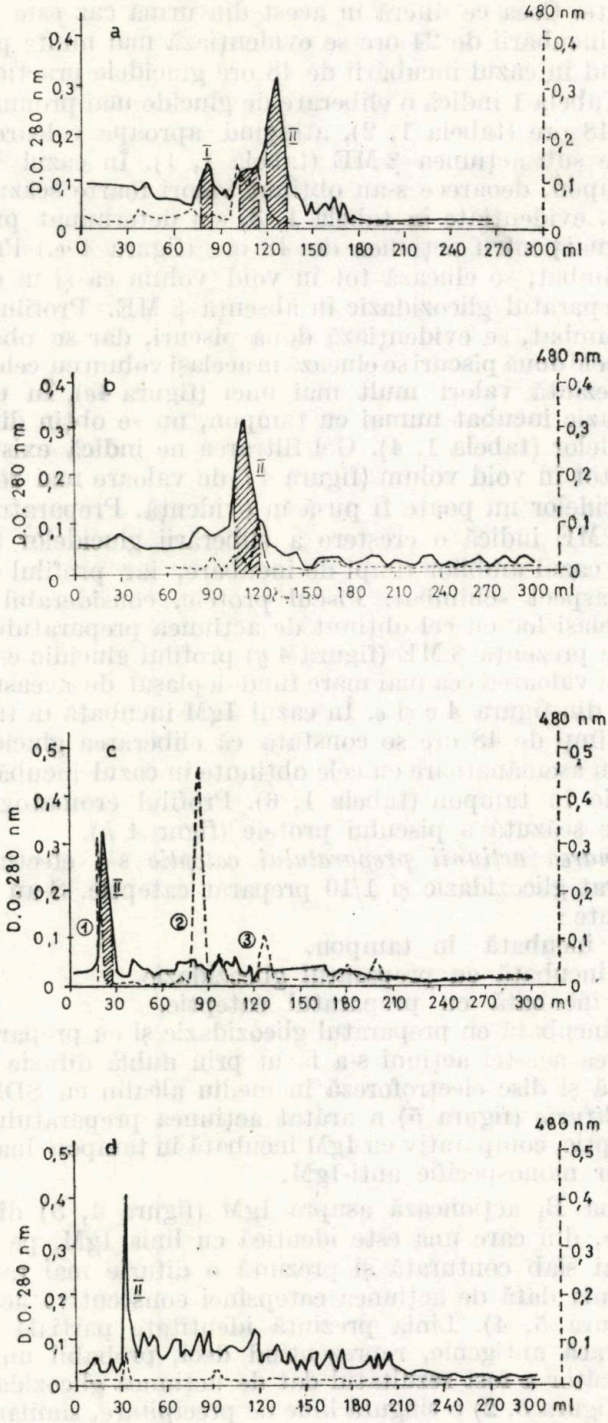
Determinarea acțiunii preparatului cateptic s-a efectuat în raport de 1/5 preparat glicozidazic și 1/10 preparat cateptic. S-au folosit următoarele variante:

1. IgM incubată în tampon.
2. IgM incubată cu preparatul glicozidazic.
3. IgM incubată cu preparatul cateptic.
4. IgM incubată cu preparatul glicozidazic și cu preparatul cateptic.

Urmărirea acestei acțiuni s-a făcut prin dublă difuzie radială, imunoelectroforeză și disc electroforeză în mediu alcalin cu SDS și uree.

Dubla difuzie (figura 5) a arătat acțiunea preparatului glicozidazic și a celui cateptic, comparativ cu IgM incubată în tampon luată ca martor. S-a folosit ser monospecific anti-IgM.

Catepsina B_1 acționează asupra IgM (figura 4, 3) dînd două linii de precipitare, din care una este identică cu linia IgM, pe cînd cea de-a doua este mai slab conturată și prezintă o difuzie mai rapidă. Ea este identică cu linia dată de acțiunea catepsinei consecutivă aceleia a glicozidazelor (figura 5, 4). Linia prezintă identitate parțială cu linia IgM fiind mai săracă antigenic, reprezentînd deci, probabil un fragment de IgM. Surprinzător a fost rezultatul dat de acțiunea glicozidazelor singure. Se constată (figura 5, 2) o singură linie de precipitare, similară cu cea dată


a
b
c
d
D.O. 280 nm
480 nm
0 30 60 90 120 150 180 210 240 270 300 ml
I
II
III
1
2
3

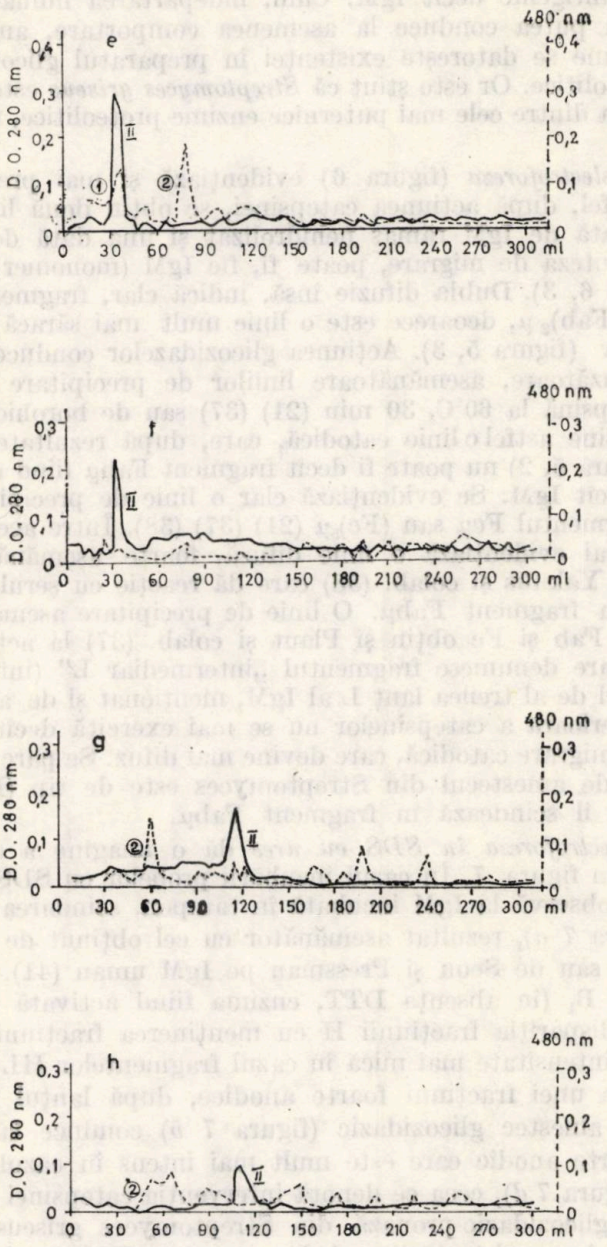


Fig. 4. — Gel filtrarea pe Sephadex G-100 în soluție de bicarbonat de amoniu 5.10^{-2}M, pH 7,5 a preparatului de IgM supus acțiunii preparatului glicozidazic timp de 24 ore, respectiv 48 ore.
Linia continuă proteine pisc I, II.
Linia discontinuă glucide pisc 1, 2, 3.

de acţiunea catepsinelor în prezenţa glicozidazelor (figura 5, 4) adică, mai săracă antigenic decît IgM. Cum, îndepărtarea numai a unei părţi glucidice, nu putea conduce la asemenea comportare, am presupus că această acţiune se datoreşte existenţei în preparatul glicozidazic a unei enzime proteolitice. Or este ştiut că *Streptomyces griseus* este producătorul pronazei, una dintre cele mai puternice enzime proteolitice, fiind o enzimă nespecifică.

Imunoelectroforeza (figura 6) evidenţiază şi mai pregnant această acţiune. Astfel, după acţiunea catepsinei, se obţin două linii de precipitare, una dată de IgM rămas nehidrolizat şi una dată de un fragment care, după viteza de migrare, poate fi, fie IgM (monomer), fie fragment Fabμ (figura 6, 3). Dubla difuzie însă, indică clar, fragmentul Fabμ sau fragmentul $(Fab)_2$ μ, deoarece este o linie mult mai săracă antigenic faţă de IgM nativ (figura 5, 3). Acţiunea glicozidazelor conduce la o imagine total surprinzătoare, asemănătoare liniilor de precipitare date de IgM tratat cu tripsină la 60°C, 30 min (21) (37) sau de borohidridă de sodiu (28). Se obţine astfel o linie catodică, care, după rezultatele de la dubla difuzie (figura 5, 2) nu poate fi decît fragment Fabμ fiind mult mai sărac antigenic decît IgM. Se evidenţiază clar o linie de precipitare, care este dată de fragmentul Fcμ sau $(Fc)_5$μ (21) (37) (38). Între aceste două fragmente se mai evidenţiază o linie difuză, foarte asemănătoare cu linia obţinută de Yakulis şi colab. (38) care dă reacţie cu serul anti-lanţ L şi prezentat ca fragment Fabμ. O linie de precipitare asemănătoare, între fragmentele Fab şi Fc obţin şi Plaut şi colab. (37) la acţiunea tripsinei la 60°C şi care denumesc fragmentul „intermediar L" (int-L) şi care ar reprezenta cel de al treilea lanţ L al IgM, menţionat şi de alţi autori (39). Acţiunea ulterioară a catepsinelor nu se mai exercită decît asupra fragmentului cu migrare catodică, care devine mai difuz. Se pare că fragmentul catodic dat de amestecul din Streptomyces este de tip $(Fab)_2$ μ, şi că, catepsina B_1 îl scindează în fragment Fabμ.

Disc electroforeza în SDS cu uree dă o imagine a cărei rezultate sînt arătate în figura 7. În cazul incubării probelor cu SDS şi βME (probele a-d) se observă la IgM incubată în tampon, scindarea în IgMs, HL, H şi L (figura 7 *a*), rezultat asemănător cu cel obţinut de Beale pe IgM de porc (40) sau de Seon şi Pressman pe IgM uman (41). Tratarea IgM cu catepsină B_1 (în absenţa DTT, enzima fiind activată anterior (20)), se constată dispariţia fracţiunii H cu menţinerea fracţiunilor IgMs, HL şi L, dar de intensitate mai mică în cazul fragmentelor HL şi L. Se constată apariţia unei fracţiuni foarte anodice, după lanţul L (figura 7 *c*). Tratarea cu amestec glicozidazic (figura 7 *b*) conduce la apariţia unui fragment foarte anodic care este mult mai intens în cazul tratării şi cu catepsină (figura 7 *d*), ceea ce denotă intervenţia catepsinei după acţiunea amestecului glicozidazic-pronază din Streptomyces griseus. Migrarea în SDS cu uree, în cazul tratării probelor numai cu SDS (probele e-h) indică aceeaşi acţiune asupra IgM a catepsinei, care are ca urmare eliberarea a două fragmente cu viteze de migrare mare (g) şi acţiunea puternică a glicozidazelor-pronază asupra IgM (f) cu formarea de fragmente Fabμ, Fcμ şi probabil lanţ L.

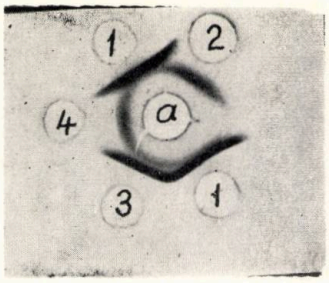


Fig. 5. — Dubla difuzie radială a preparatului de IgM supus acțiunii preparatului glicozidazic și acțiunii preparatului cateptic. S-a folosit ser monospecific anti-IgM
1 = IgM incubată în tampon; *2* = IgM incubată cu preparat glicozidazic; *3* = IgM incubată cu preparat cateptic; *4* = IgM incubată cu preparat glicozidazic și cu preparat cateptic; *a* — ser monospecific anti-IgM.

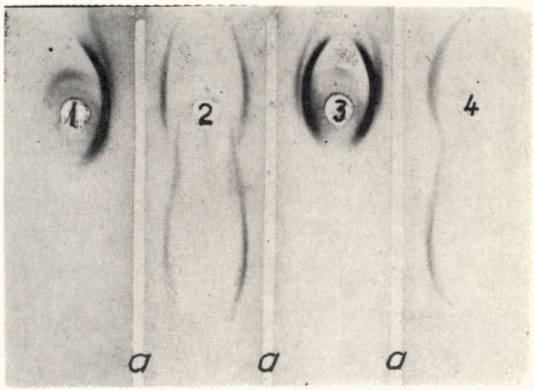


Fig. 6. — Imunoelectroforeza preparatului de IgM supus acțiunii preparatului glicozidazic și acțiunii preparatului cateptic.
1, 2, 3, 4, a, aceleași indicații ca în fig. 5.

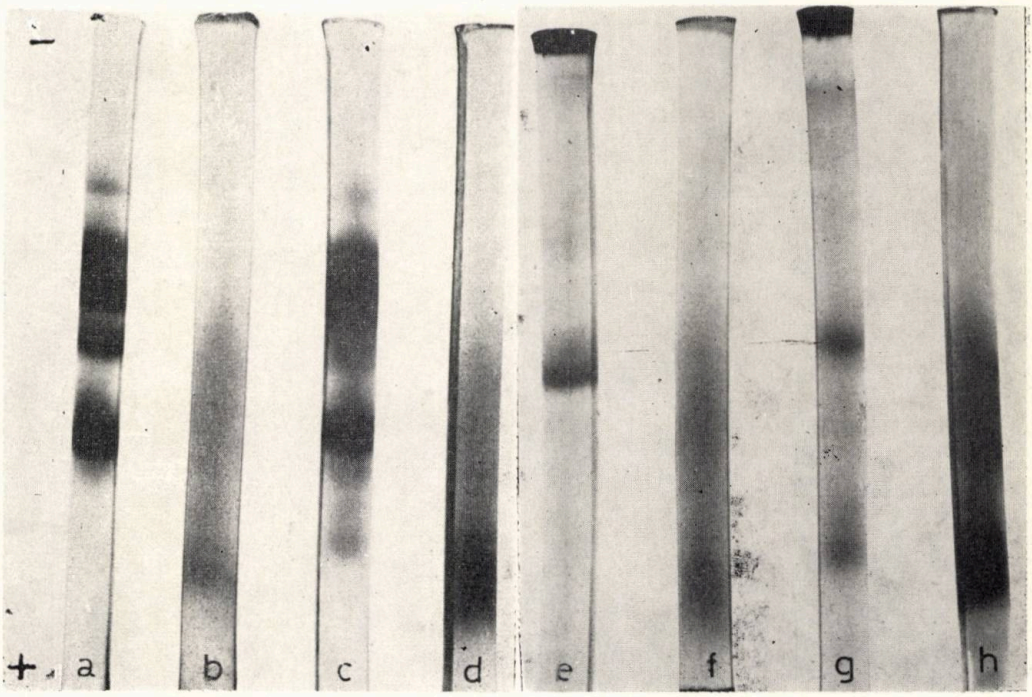


Fig. 7. — Disc electroforeza în mediu alcalin cu SDS și uree a preparatului de IgM supus acțiunii preparatului glicozidazic și preparatului cateptic.
a, b, c, d, incubare cu SDS + βME; *e, f, g, h,* incubare cu SDS.

DISCUȚII

Catepsina B_1 din ficatul uman a fost activată în prealabil cu DTT și plusul de reducător a fost separat prin trecere pe coloană (20). În felul acesta am evitat reducerea cu DTT ca activator al catepsinei a legăturilor —SS— intersubunități și interlanțuri la IgM.

Deoarece coloana întrebuințată pentru separarea glucidelor a fost de Sephadex G-100, nu s-au putut separa eventualele fracțiuni proteice mai mari. Glicozidazele cu pronaze acționează asupra IgM redusă dînd un compus proteic cu greutate moleculară mică, probabil Fc (20).

Tratarea IgM cu preparatul nostru, în absența βME dă un singur compus, în void volum, care ar putea fi format din mai multe componente.

Curba glucidelor eliberate demonstrează acțiunea glicozidazelor asupra IgM, nu numai acțiunea pronazei. Numai că, nu putem ști ordinea intrării în acțiune a celor două enzime din amestec.

De aceea, rezultatele obținute prin acțiunea amestecului glicozidazic pot implica și partea glucidică. Asemănarea produșilor de reacție cu aceia obținuți cu tripsină la 60°C sau cu papaină, ne conduce spre ipoteza acțiunii predominante a pronazei. Rezultatele obținute cu amestecul glicozidazic la imunoelectroforeză nu sînt confirmate de către disc electroforeză în SDS cu uree, cu și fără tratarea anterioară cu βME, deoarece se obține doar un fragment cu viteză de migrare foarte mare, care este, după Zikan și Bennett, un fragment provenit din Fabμ (21), sau un fragment provenit din Fc (40), nefiind deci $(Fc)_5\mu$, cum ar indica imunoelectroforeza.

Nu este exclus ca această bandă să fie datorită celui de-al treilea, lanț al IgMs, evidențiat prin imunoelectroforeză (37).

Catepsina B_1 umană acționează puțin asupra IgM în raportul 1/10 în sensul eliberării unor fragmente Fab și menținerii de molecule IgM intacte; totodată se formează și fragmente cu greutate moleculară mică, sub aceea a lanțului L (după migrarea în SDS cu uree).

Aceleași rezultate de la disc electroforeză, confirmă acțiunea catepsinei asupra fragmentelor obținute prin amestecul glicozidazic.

CONCLUZII

Amestecul glicozidazic-pronazic acționează asupra populației d-IgM scindînd moleculele în fragmente Fcμ cu Fabμ și un compus interi mediar care ar putea fi cel de al treilea lanț L al IgM_s. Nu putem stabi dacă partea glucidică are vreun rol în acest tip de scindare.

Catepsina B_1 umană acționează asupra IgM dînd fragment Fab și IgM neatacată.

Prezentat la redacție
la 18 mai 1979

Institutul de Științe Biologice
București.

THE ROLE OF CARBOHYDRATE MOIETY IN THE INTRACELLULAR DEGRADATION OF GLYCOPROTEINS. VIII. HUMAN CATHEPSIN B_1 HYDROLYSIS OF IgM WITH AND WITHOUT A GLYCOSIDASE MIXTURE OF *STREPTOMYCES GRISEUS*

SUMMARY

The carbohydrates were partially removed from IgM by using a glycosidase mixture from *Streptomyces griseus* with and without β-mercaptoethanol (βME) as reducing agent, comparatively with the native IgM (IgM untreated with the glycosidase mixture and IgM treated with βME only). The subsequent hydrolysis was performed with cathepsin B_1 from human liver previously activated with dithiothreitol (DTT) comparatively with the native IgM (with and without the glycosidase mixture, comparatively with the untreated IgM). The action of pronase, presumed to exist in the glycosidase mixture, was also determined. The modifications obtained were followed by double diffusion, immunoelectrophoresis, gel filtration, disc electrophoresis in alkaline medium with sodium dodecyl sulphate (SDS) and urea. The results show the presence of pronase in the glycosidase mixture. Fcμ and Fabμ fragments and an intermediate compound presumed to be the third L chain of IgM_s were obtained. Human cathepsin B_1 produced Fab fragments and intact IgM

BIBLIOGRAFIE

1. B. Spragg, J. R. Clamp, Biochem, J., **114**, 57 (1969).
2. I. Johnson, J. R. Clamp, Biochem. J., **123**, 739 (1971).
3. M. M. Hurst, W. Wiedemeyer, J. Zikan, J. C. Bennett, J. Immunol., **110**, 840 (1973).
4. J. R. Clamp, I. Johnson, in Glycoproteins, ed. A. Gottschalk, Elsevier, Amsterdam, 5A, 1972, p. 612.
5. T. Muramatzu, J. Biol. Chem., **246**, 5535 (1971).
6. R. Hoide, T. Muramatzu, J. Biol. Chem., **249**, 4897 (1974).
7. C. Mihail, C. Motaş, F. Mihalcu, St. cerc. biochim., **22**, 25 (1979).
8. H. Chaplin, S. Cohen, E. M. Press, Biochem. J., **95**, 256 (1965).
9. J. E. Morris, F. P. Inman, Biochemistry, **7**, 2851 (1968).
10. F. P. Inman, R. Hazen, J. Biol. Chem., **243**, 5598 (1968).
11. D. Beale, A. Feinstein, FEBS Letters, **7**, 175 (1970).
12. J. Zikan, J. C. Bennett, Biochim. Biophys. Acta, **319**, 447 (1973).
13. A. Schimizu, F. W. Putnam, C. Paul, J. R. Clamp, I. Johnson, Nature, **231**, 73 (1971).
14. M. Arakawa, T. Muramatzu, J. Biochem., **76**, 307 (174).
15. A. L. Tarentino, F. Maley, J. Biol. Chem., **249**, 811 (1974).
16. D. Beale, N. Buttress, Biochem. Biophys. Acta, **181**, 250 (1969).
17. A. G. Plaut, T. B. Tomasi, Proc. Nat. Acad. Sci., **65**, 318 (1970).
18. J. P. Chen, M. Reichlin, T. B. Tomasi, Biochemistry, **8**, 2246 (1969).
19. C. Mihăescu, M. Seligman, Immunochemistry, **5**, 457 (1968).
20. K. Onoue, T. Kishimoto, Y. Yamamura, J. Immnuol., **100**, 238 (1968).
21. J. Zikan, J. C. Bennett, Eur. J. Immunol., **3**, 415 (1973).
22. G. Florent, D. Lehman, F. W. Putnam, Biochemistry, **13**, 2482 (1974).
23. R. J. Dean, *Cellular degradation processes*, Chapman and Hall, London, 1978, p. 51.
24. P. Bohley, S. Riemann, H. Kirschke, J. Langner, B. Wiederanders, S. Ansorge H. Hanson, in *Cell differentiation in microorganisms, plants and animals*, ed., L. Nover, K. Mothers, VEB. Gustav Fisher Verlag Jena, 1977, p. 225.

25. R. D. Wochner, G. Drews, W. Strober, T. A. Waldman, J. Clin. Invest., **45**, 321 (1966).
26. D. Yasmeen, J. R. Ellerson, K. J. Dorrington, R. H. Painter, J. Immunol., **116**, 518 (1976).
27. J. C. Bennett, Biochemistry, **7**, 3340 (1968).
28. A. P. Fletcher, G. S. Marks, R. D. Marshall, A. Neuberger, Biochemical J., **87**, (2), 265 (1962).
29. H. Lovenstein, A. Jngild, Anal. Biochem., **71**, 204 (1976).
30. C. Mușolan, S. Vasu, St. cerc. biochim., **20**, 209 (1977).
31. A. J. Barrett, Biochemical J., **131**, 809 (1973).
32. A. J. Barrett, Biochemical J., **117**, 601 (1970).
33. A. L. Tarentino, T. H. Plummer, F. Maley, J. Biol. Chem., **249** (3), 818 (1974).
34. M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith, Anal. Chem., **28**, 350 (1956).
35. H. Menninger, K. Fehr, A. Böni, K. Otto, Immunochemistry, **13**, 633 (1976).
36. R. Kleine, F. V. Shmakova, V. A. Lapuk, G. V. Vikha, E. D. Kaverzneva, Immunochemistry, **12**, 825 (1975).
37. A. G. Plaut, N. Calvanico, T. B. Tomasi, J. Immunol., **108**, 389 (1972).
38. V. Yakulis, J. Schmale, N. Costea, P. Heller, J. Immunol., **100**, 525 (1968).
39. T. Suzuki, Immunochemistry, **14**, 325 (1977).
40. D. Beale, Biochim. Biophys. Acta, **351**, 13 (1974).
41. B. K. Seon, D. Pressman, Immunochemistry, **13**, 895 (1976).

CERCETĂRI CHEMOTAXONOMICE LA PLANTE SUPERIOARE. XIII. PIGMENŢII CAROTENOIDICI ŞI CLOROFILIENI DIN *CHELIDONIUM MAJUS* L

GAVRIL NEAMŢU, GHEORGHE ILLYES, TIBERIU LÁSZLO

Rezumat. S-au determinat pigmenţii carotenoidici şi clorofilieni din frunze şi flori de *Chelidonium majus*.

În frunze, cu excepţia α-criptoxantinei, se găsesc carotenoide comune, frecvent întîlnite în ţesuturile verzi. Raportul dintre conţinutul β-carotinei şi al luteinei este supraunitar, invers decît în frunzele majorităţii plantelor superioare terestre.

În flori predomină carotenoidele epoxidice faţă de cele hidrocarburice. Dintre xantofile s-a identificat numai luteina, care reprezintă pigmentul principal.

Dintre carotenoidele caracteristice, cu importanţă carotenotaxonomică pentru *Chelidonium majus* menţionăm α-criptoxantina în frunze, ε-carotina şi γ-γ-carotina în flori.

Raportul dintre conţinutul clorofilei *a* şi *b* este de 1,54 în frunze şide 2,48 în flori.

În cadrul cercetărilor chemotaxonomice ce le efectuăm la plantele superioare, s-a întreprins un studiu asupra pigmenţilor carotenoidici şi clorofilieni din plantele laticifere, cu scopul de a stabili eventualii pigmenţi specifici şi caracteristici acestui grup important de plante, bogate în substanţe terpenice şi în alcaloizi.

În această lucrare se prezintă pigmenţii carotenoidici şi clorofilieni din frunze şi flori de *Chelidonium majus*, plantă laticiferă importantă, datorită compuşilor chimici ce-i conţine, în special a alcaloizilor, care sînt utilizaţi predominant în tratamentul bolilor de ficat şi ale sistemului nervos (1, 2, 3, 4, 5).

Sub aspect botanic, *Chelidonium majus* este o plantă ierboasă perenă, cu flori galbene, înaltă de aproximativ un metru. Creşte pe terenuri umede şi umbroase, evitînd lumina solară directă. Din organele aeriene şi din rizomi, prin ruperea acestora, curge un lichid vîscos de culoare portocalie (1, 6).

Cu toate că *Chelidonium majus* are un areal mare de răspîndire, fiind cunoscută în numeroase ţări ca o plantă medicinală importantă, n-a fost cercetată pînă în prezent sub aspectul pigmenţilor fotosintetizanţi.

MATERIAL ŞI METODE

Pentru identificarea şi determinarea pigmenţilor carotenoidici şi clorofilieni din frunze de *Chelidonium majus* s-a folosit material proaspăt- recoltat din Grădina botanică a tului agronomic „Dr. Petru Groza" din Cluj-Napoca, în lunile mai—iunie 1978.

Extragerea pigmenților din frunze s-a făcut cu acetonă pînă ce extractul a rămas incolor. Din extractul acetonic pigmenții au fost transferați ulterior în eter de petrol. Pigmenții din flori s-au extras cu un amestec de eter de petrol-acetonă-metanol, în raport de 6 : 3 : 1.

Pentru separarea și purificarea pigmenților s-a folosit în cea mai mare patre cromatografia pe coloană, utilizînd ca adsorbant amestec de oxid de magneziu și nisip fin, în raport de 2 : 1 în greutate. Purificarea carotenoidelor s-a făcut pe coloane adsorbante formate din oxid de magneziu și Hyflo Super Cell, în raport de 1 : 2 în volum. Coloanele cromatografice s-au developat cu un amestec de eter de petrol-benzen-acetonă, în raport de 6 : 2 : 2. Pentru cromatograme de amestec s-a folosit și cromatografia în strat subțire, utilizîndu-se ca adsorbant amestec de oxid de magneziu și silicagel în raport de 1 : 1 în volum, iar ca developant amestec de eter de petrol-cloroform-alcool etilic, în raport de 30 : 2 : 1.

Saponificarea pigmenților carotenoidici din flori s-a făcut cu soluția etanolică de hidroxid de potasiu 8 %, la întuneric, timp de 12 ore, la temperatura camerei.

Identificarea și determinarea pigmenților carotenoidici s-a făcut prin metode cromatografice și spectrofotometrice, la fel ca și în lucrările anterioare (7, 8).

Conținutul pigmenților carotenoidici și clorofilieni prezentați în tabelele 1 și 2 reprezintă media a trei determinări.

Clorofilele s-au identificat și determinat după metoda prezentată de I. Maróti și Eva Gabnai (9).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Cromatograma și conținutul pigmenților carotenoidici și clorofilieni din frunzele de *Chelidonium majus* se prezintă în tabela 1.

Tabela 1

Cromatograma și conținutul pigmenților carotenoidici și a clorofilelor din frunze de *Chelidonium majus* L., în μg/g material proaspăt

Pigment	Maximele spectrelor de absorbție în eter de petrol, în nm	Cantitatea în μg/g
A. *Pigmenți carotenoidici*		
Neoxantină	466, 436, 417	186
Violaxantină	468, 440, 418	134
Zeaxantină	478, 448, 424	58
Luteină	472, 444, 421	342
β-criptoxantină	475, 445, 425	82
α-criptoxantină	475, 443, 420	45
β-carotină	477, 448, 424	437
Total carotenoide		1284
B. *Pigmenți clorofilieni*		
Clorofila *b*	640, 590, 458	481
Clorofila *a*	660, 618, 420	742
Total clorofile		1223

În frunzele de *Chelidonium majus*, cu excepția α-criptoxantinei se găsesc carotenoide comune, frecvent întîlnite în frunzele plantelor autotrofe. Raportul dintre conținutul principalelor carotenoide foliare — β-carotina și luteina — este supraunitar, invers decît în frunzele majorității plantelor superioare terestre.

Ca aspect caracteristic, specific acestei plante, cu importanță chemotaxonomică, este prezența în cantitate relativ mare a α-criptoxantinei,

pigment ce nu s-a identificat pînă acum în frunze. Semnificativ este de asemenea conţinutul ridicat al neoxantinei şi violaxantinei faţă de cel al zeaxantinei, α şi β-criptoxantinei. Toate carotenoidele cu grupări hidroxilice (α şi β-criptoxantina, luteina, zeaxantina, violaxantina, neoxantina) se găsesc sub formă liberă şi nu sub formă de ester. Dintre carotenoidele hidrocarburice s-a identificat numai β-carotina, care are un conţinut ridicat, mărind astfel valoarea provitaminică A a acestor frunze.

În ce priveşte pigmenţii clorofilieni se remarcă conţinutul ridicat al clorofilei *b*. Raportul dintre conţinutul clorofilei *a* şi *b* este de 1,54, mult mai mic decît la restul plantelor superioare.

Cromatograma şi conţinutul pigmenţilor carotenoidici şi clorofilieni din florile de *Chelidonium majus* se prezintă în tabela 2.

Tabela 2

Cromatograma şi conţinutul pigmenţilor carotenoidici şi a clorofilelor din flori de *Chelidoniums maju L.*, în μg/g material proaspăt

Pigment	Maximelede absorbţie, în eter de petrol, în nm	Cantitatea în μg/g
A *Pigmenţi carotenoidici*		
Neoxantină-ester	466, 435, 417	192,3
Violaxantină-ester	467, 438, 418	288,4
Pigment neidentificat I		
Anteraxantină-ester	470, 445, 421	78,8
Eloxantină-ester	470, 440, 416	66,4
Flavoxantină-ester	448, 421, 398	164,8
Luteină-ester	472, 444, 422	367,0
Pigment neidentificat II		
β-carotin-diepoxid	468, 440, 417	52,6
ɔ-carotina	478, 448, 424	54,3
ε-carotina	470, 440, 416	46,6
γ-γ-carotina	468, 438, 414	35,5
Neurosporen	471, 439, 416	220,4
Total carotenoide		1567,1
B. *Pigmenţi clorofilieni*		
Clorofila *b*	640, 590, 458	86,9
Clorofila *a*	660, 618, 420	216,2
Total clorofile		303,1

Din determinările efectuate reiese că florile acestei specii conţin un număr mare de pigmenţi carotenoidici. Sub aspectul compoziţiei, la fel ca şi în frunze, predomină (calitativ şi cantitativ) carotenoidele oxigenate faţă de cele hidrocarburice.

După structura moleculară carotenoidele identificate pot fi grupate în următoarele categorii:

— Carotenoide epoxidice (neoxantina, violaxantina, anteraxantina, eloxantina, β-carotin-diepoxid).

— Carotenoide furanoidice (flavoxantina).

— Xantofile (luteina).

— Carotenoide hidrocarburice (ε-carotina, γ-γ-carotina, neuro-sporen, β-carotina).

Ca aspect caracteristic apare prezența unui mare număr de carotenoide epoxidice. Dintre xantofile se găsește numai luteina, care are conținutul cel mai ridicat. În cantitate mare se află și neurosporerenul, care are un rol însemnat în biosinteza carotenoidelor cu sistem polienic superior (10). β-Carotina, care în frunze reprezintă pigmentul principal, în flori se află în cantitate foarte mică. Spre deosebire de frunze toate carotenoidele cu grupări hidroxilice se găsesc în flori sub formă de ester nu în stare liberă.

Ca un aspect caracteristic, cu importanță chemotaxonomică, este prezența în flori a ε-carotinei și a γ-γ-carotinei, pigmenți întîlniți mai des în organismele animale decît în cele vegetale (11—12). Cercetările ulterioare, efectuate cu un număr mare de plante laticifere, vor putea confirma sau infirma caracterul specific, cu importanță carotenotaxonomică a α-criptoxantinei din frunze și a ε-carotinei și γ-γ-carotinei din flori ca pigmenți caracteristici pentru întregul grup de plante laticifere sau numai pentru unele specii din diferite genuri și familii de plante.

Pigmentul neidentificat I are proprietăți asemănătoare luteoxantinei, iar pigmentul II are proprietăți asemănătoare monohidroxi-ε-carotinei. Nu s-au identificat în flori carotenoide cetonice și nici cu structură monociclică.

În flori, alături de pigmenții carotenoidici se găsesc pigmenți flavonoidici și alcaloizi colorați, care se separă de carotenoide în timpul extragerii și al saponificării.

Pigmenții clorofilieni din flori provin din receptacul și fragmente din codițele florilor. Raportul dintre conținutul clorofilei *a* și *b* este mai mare decît în frunze, fiind de 2,48. Conținutul celor două clorofile este cu mult mai mic în flori decît în frunze.

CONCLUZII

Chelidonium majus este o plantă laticiferă cu un conținut ridicat și variat de pigmenți carotenoidici în frunze și flori. Pigmentul carotenoidic principal din frunze este β-carotina, alături de care s-a identificat în cantitate relativ mare luteina, neoxantina și violaxantina, iar în cantitate mai mică zeaxantina, β-criptoxantina și α-criptoxantina, ultimul pigment fiind identificat pentru prima dată în frunzele plantelor superioare.

În flori predomină carotenoidele epoxidice (neoxantina, violaxantina, anteraxantina, eloxantina, β-carotindiepoxid) față de furanoizi (flavoxantina), xantofile (luteina) și carotenoidele hidrocarburice (ε-carotina, γ-γ-carotina, neurosporen, β-carotina).

Carotenoidele cu grupări hidroxilice se găsesc în frunze în stare liberă iar în flori sub formă de ester.

Dintre pigmenții clorofilieni atît în frunze cît și în flori s-a identificat clorofila *a* și *b*. Raportul dintre conținutul celor două clorofile este mai mic în frunze decît în flori.

Prezentat la redacție
la 10 februarie 1979

Disciplina de chimie și biochimie vegetală
a Institutului agronomic „Dr. Petru Groza"
Cluj-Napoca

CHEMOTAXONOMICAL RESEARCHES IN HIGHER PLANTS XIII. CAROTENOID AND CHLOROPHYLL PIGMENTS FROM *CHELIDONIUM MAJUS L.*

SUMMARY

Carotenoid and chlorophyll pigments from the leaves and flowers of *Chelidonium majus L.* were determined.

In the leaves — with the exception of α-cryptoxanthin — common carotenoids frequently present in plant green tissues were found.
The ratio between β-carotene and lutein was supraunitary, conversely than in the leaves of the majority of land higher plants.
In the flowers the epoxy carotenoids prevailed versus hydrocarbon carotenoids. Amongst xanthophylls only lutein was identified, which in fact was the principal pigment.
Amongst the characteristic carotenoids having a carotenotaxonomical significance for *Chelidonium majus L.* are to be mentioned α-cryptoxanthin in leaves and respectively ε-carotene and γ-γ-carotene in flowers.
The ratio between the a-chlorophyll and b-chlorophyll was 1.54 in leaves and 2.48 in flowers.

BIBLIOGRAFIE

1. F. Crăciun, O. Bojor, M. Alexan, *Farmacia Naturii*, Editura CERES, Bucureşti, 1976, p. 146
2. St. Stoian, E. Savopol, *Extracte farmaceutice vegetale*, Editura medicală, Bucureşti, 1977, p. 240.
3. D. Wanda, W. Ryszard, Farm. pol., **29**, 695 (1973).
4. M. Turowska, Herba pol., **15**, 18 (1969).
5. Ph. Matile, B. Jans, R. Rickenbacher, Biochim. Physiol. Pflanz., **161**, 447 (1970).
6. C. Constantinescu, A. Agopian, *Plante medicinale din flora spontană*, Uniunea Centrală a Cooperativelor de Consum, 1973, ediţia a III-a, p. 228.
7. G. Neamţu, C. Bilaus, T. László, L. K. Simpson, Rev. roum. Biochim., **13**, 203 (1976).
8. G. Neamţu, Gh. Illyes, St. cerc. biochim., **21**, 36 (1978).
8. I. Maroti, E. Gabnai, Acta. Biol. Szeged., **17**, 67 (1971).
10. T. W. Goodwin, *Carotenoids* (Ed. O. Isler), Birkhauser Verlag Basel und Stuttgart, 1971, p. 577.
11. R. Katayama, K. Hirata, H. Yokoyama, C. O. Chichester, Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., **36**, 708 (1970).
12. E. G. Andrewes, L. S. Jenson, Acta Chem. scand., **27**, 1401 (1973).

CHEMOTAXONOMICAL RESEARCHES IN HIGHER PLANTS
XIII. CAROTENOID AND CHLOROPHYLL PIGMENTS FROM CHELIDONIUM MAJUS L.

SUMMARY

Carotenoid and chlorophyll pigments from the leaves and flowers of *Chelidonium majus* L. were determined.

In the leaves — with the exception of a-cryptoxanthin — common carotenoids frequently present in plant green tissues were found. The ratio between β-carotene and lutein was supranormaly, conversely than in the leaves of the majority of land higher plants.

In the flowers the cepaxy carotenoids prevailed versus hydrocarbon carotenoids. Amongst xanthophylls only lutein was identified, which in fact was the principal pigment.

Amongst the characteristic carotenoids having a carotenoxanthinal significance for *Chelidonium majus* L. are to be mentioned a-cryptoxanthin in leaves and respectively ε-carotene and γ-carotene in flowers. The ratio between the a-chlorophyll and b-chlorophyll was 1.3:1 in leaves and 2:1 in flowers.

BIBLIOGRAPHY

1. F. Cramer, O. Bonn, *N. Archiv*, Pflanzenk. Vaduz, Editura (Springer, Berlin), 1978, p. 116.
2. Sp. Popescu, E. Antonescu, Farmacognozie (Farmacognozie teoretică, Editura medicală, Bucureşti, 1977, p. 210.
3. D. Wasko, W. Hyszko, Pharm. pol., 29, 805 (1973).
4. V. Tsukowska, Herba pol., 18, 15 (1972).
5. Fr. Mazur, R. Jaros, E. Niedzwiedzki, Biochim. Physiol. Pflanz., 161, 447 (1972).
6. C. Cristea-Cristescu, A. Aburel, Plante medicinale din flora spontană, Editura Centrală a Cooperativelor de Consum, 1973, ediţia a III-a, p. 322.
7. G. Negrău, C. Bucur, T. Lăzărescu, L. K. Simeon, Rev. roum. biochim., 13, 203 (1976).
8. C. Negrău, Gh. Iacob, St. cerc. biochim., 21, 56 (1978).
9. I. Mănoiu, E. Ciobanu, Acta Biol. Szeged., 17, 67 (1971).
10. T. W. Goodwin, Carotenoids (Ed. O. Isler), Birghauser Verlag Basel und Stuttgart, 1971, p. 577.
11. H. Kayama, K. Hirata, H. Yokoyama, C. O. Chichester, Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 26, 708 (1970).
12. E. C. Nordewis, L. S. Jensen, Acta Chem. «and.», 22, 1101 (1973).

METODE UTILIZATE ÎN ANALIZA UNOR COMPONENTE ALE BILEI UMANE

GR. POPA*), ILEANA FUNDUC

Rezumat. Se discută variantele metodologice utilizate în explorarea bilei hepatice şi veziculare, adaptate particularităţilor acestui produs biologic. Pe lîngă modalităţile clasice de analiză (metode spectrofotometrice, spectroscopie de absorbţie atomică, fotometrie de flacără), se pune accentul pe metodele mai moderne de separare utilizate (electroforetice şi cromatografice), care au necesitat adaptări deosebite. Se arată relaţia dintre datele de laborator şi patologia bolilor hepato-biliare.

Bila, umoare cu rol emonctorial, excretoriu, dar totodată şi umoare exocrină, este greu accesibilă atît din punctul de vedere al localizării sale în organism cît şi din punctul de vedere al particularităţilor compoziţiei sale (preponderenţa apei alături de o cantitate extrem de mică de solide totale, denaturare la temperatura normală, componenţi ce îngreunează manipularea şi analiza sa, forma în care se găsesc unii dintre aceştia).

Dat fiind că bila este un mediu complex, metodologia de investigare a ei trebuie în aşa fel aleasă încît să facă faţă acestor dificultăţi, neafectînd cu nimic precizia rezultatelor. Este vorba, deci, de efectuarea analizei unui amestec de componenţi în concentraţii mici (unii din ei chiar în urme) dintr-un mediu biologic complex.

Fiziopatologia bolilor în care elaborarea sau scurgerea bilei sînt stînjenite, morfogeneza leziunilor consecutive pătrunderii ei dincolo de sistemul canalicular biliar, reacţiile acestui din urmă sistem la eventualele schimbări ale componenţilor ei, patogenia colelitiazei, bilei calcice şi bilei albe, cer în mod inevitabil studierea analitică corespunzătoare a compoziţiei sale fizico-chimice.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-a lucrat pe 58 bile hepatice şi 18 bile veziculare. Metodologia aplicată studierii acestor probe de bilă a fost variată, uneori analoagă cu cea aplicată aceloraşi componenţi din ser, alteori cu totul particulară.

Metodele spectrofotometrice au permis determinarea :

— colesterolului (1), (2), după îndepărtarea sărurilor biliare şi a lipoproteinelor, finalizînd prin reacţia Libermann-Bourchard ;

— fosfolipidelor (3) prin formarea finală a albastrului de molibden ;

— pigmenţilor biliari (4) după metoda clasică cu formare de compuşi azoici ;

— proteinelor (5), specifică bilei şi prima oară aplicată la noi în ţară, după indicaţiile din literatură, care se execută pe o hîrtie de filtru specială şi colorare finală cu albastru de brom fenol.

Cu spectroscopia de absorbţie atomică s-au dozat metalele Cu, Zn, Fe, Cr, Pb, Hg, ultimile cinci, prima oară în literatură.

Dintre metodele spectrale de emisie, fotometria de flacără a dat posibilitatea determinării clasice a Na, K şi Ca biliare.

Metodele de separare (cromatografice şi electroforetice) au fost utile în sensul determinării componenţilor unor amestecuri şi anume:

— aminoacizi (cromatografie pe hîrtie) (6), (7);

— lipide (cromatografie pe strat subţire) (8), (9), (10);

— acizi biliari (gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă (11), (12);

— enzime (leucin amino peptidază (13), (14), (15) şi gamma glutamil transpeptidaza (16), (17) (electroforeză pe gel de agar).

Aceste metode din urmă, pentru a putea fi realizate, au necesitat concepţii şi adaptări originale.

REZULTATE

Prin datele obţinute s-au putut vedea variaţiile diverşilor componenţi ai bilei hepatice (tabela 1) şi ai bilei veziculare (tabela 2) în diverse cazuri patologice. De asemenea, studiul desfăşurării electroforetice a enzimelor leucin aminopeptidază şi gamma glutamil transpeptidază a arătat localizarea proteică a fracţiunilor cu activitate maximă în stări patologice înainte şi după intervenţia chirurgicală în cazul bilei şi a serului (fig. 1).

Tabela 1

Concentraţiile componentelor bilei hepatice

Componentul biliar	Unit. de măsură	Valori normale din literatură	Limitele val. obţinute
Colesterol	mg%	60—310[18] [19]	270—740
Fosfolipide	mg%	100—710[20] [21]	25—340
Acid colic	mg/ml	—	25—90
Acid dezoxicolic	mg/ml	—	11—37,5
Acid litocolic	mg/ml	—	3—9
Acid chenodezoxicolic	mg/ml	—	30—55
Acizi biliari totali	mg/ml		89—101,5
Bilirubină totală	mg‰	330—2100[19]	101—315
Proteine	g‰	0,3—0,8[22] [23]	0,51—9,4
Sodiu	mEq/l	46—154[18][24][25][26][27]	78—164
Potasiu	mEq/l	4,2—5,3[18][24][25][26][27]	4,6—6,2
Calciu	mEq/l	4,9[18][24][25][26][27]	3,2—5,4
Cupru	mg%	—	0,2—3,12
Plumb	mg%	—	0—0,12
Mercur	microgr. %	—	0,56—1,36
Zinc	mg%	—	0,6—4,8
Fier	mg%	—	0,4—19,4
Crom	mg%	—	0,08

Tabela 2

Concentraţiile componentelor bilei veziculare

Componentul biliar	Unitatea de măsură	Valori normale din literatură	Limitele valorilor obţinute
Colesterol	mg%	116—1250[18]	20—1900
Fosfolipide	g%	0,1—5,8[20][21]	0,1—3,25

Varianta metodei gaz cromatografice de determinare a acizilor biliari a permis ca numai în 16′ să se poată realiza o separare aproape totală, ce se poate urmări în figura 2. Mai mult, acidul litocolic a fost verificat şi prin cuplarea gaz cromatografiei cu spectrometria de masă (fig. 3).

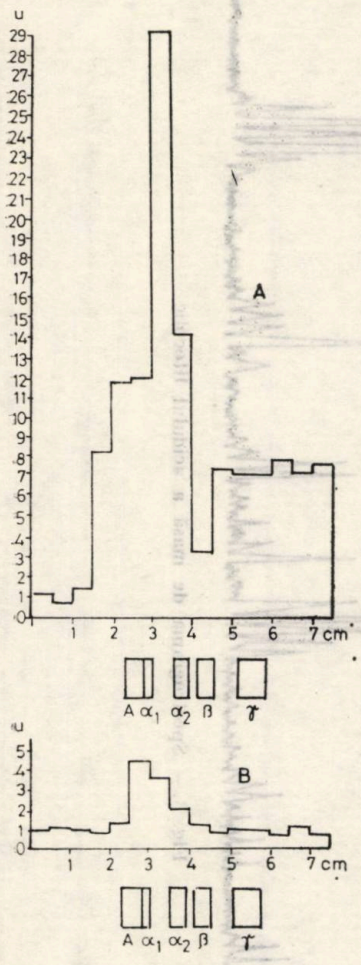


Fig. 1. — Distribuţia leucin aminopeptidazei într-un cîmp electric în cazul unei bile hepatice (*A*) şi a aceluiaşi ser (*B*) într-o colecistolitiază după ablaţia veziculei

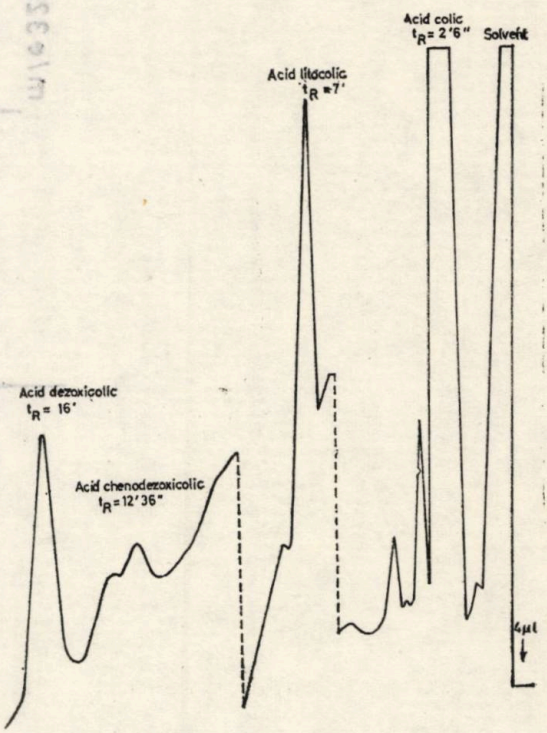


Fig. 2. — Separarea gaz-cromatografică a acizilor biliari din bila hepatică

Cele trei lipide importante ale bilei (acizii biliari, colesterol şi fosfolipide) au fost utilizate în reprezentările grafice şi numerice care au reflectat capacitatea litogenă a bilei, ce au făcut obiectul unei lucrări precedente (12).

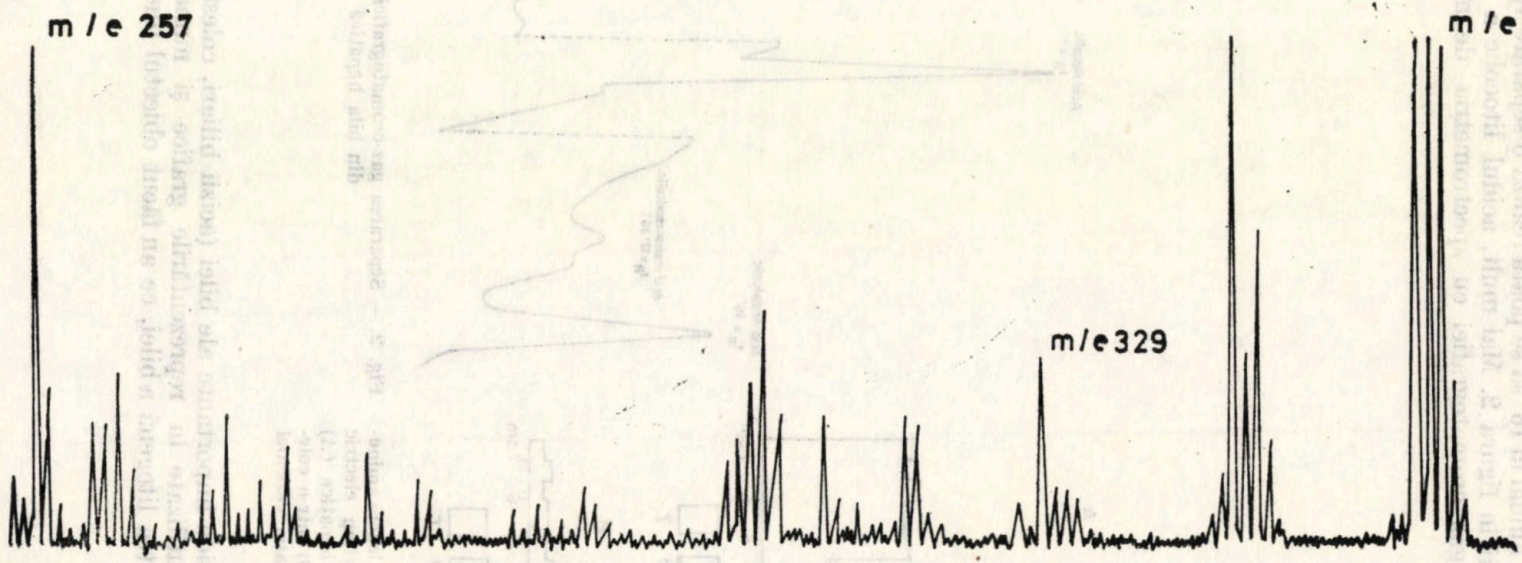


Fig. 3. — Spectrograma de masă a acidului litocolic

DISCUȚII

După cum s-a văzut, bila umană, implicînd mari dificultăți de manipulare și analiză, dozarea componenților săi a necesitat folosirea unor metode de mare putere de rezoluție și sensibilitate. Imposibilitatea de a avea normali de referință ca în cazul celorlalte umori din organism, extrem de marea variabilitate a gradului de concentrare a bilei în funcție de timp, variația compoziției sale cu dieta și momentul recoltării, cît și multitudinea variantelor metodologice pentru același component și a modului de exprimare a datelor, limitează întrucîtva constanța și concordanța rezultatelor în raport cu datele din literatură.

Cunoașterea compoziției bilei este de mare utilitate în stabilirea diagnosticului bolilor hepato-biliare. Emiterea unui diagnostic diferențial pe baza unor determinări izoenzimatice pre- și post-operatorii, cît și reflectarea capacității litogene a bilei prin reprezentarea compoziției lipidice, constituiesc dovezi elocvente în acest sens.

Prezentat la redacție
la 10 octombrie 1978

Spitalul Clinic Fundeni,
Clinica de Hematologie,
București
*) *Institutul Național de Chimie,*
Catedra de Chimie
Analitică,
București

METHODS USED IN THE ANALYSIS OF SOME COMPONENTS OF HUMAN BILE

SUMMARY

The various methods used in the exploration of hepatic and vesicular bile, adjusted to the particularities of this biologic product, are discussed. Besides the classical methods of analysis (spectrophotometry, spectroscopy in atomic absorption, flame-photometry) a special stress is laid upon the more modern methods, i.e. electrophoresis and chromatography in which special adaptations became necessary. The correlation between laboratory data and the pathology of liver and bile ducts is demonstrated.

BIBLIOGRAFIE

1. E. Andrews, L. Hrdina, Proc. Soc. Exper. Biol., **29**, 1102 (1932).
2. F. Rappaport, F. Eichorn, Clin. Chim. Acta, **5**, 160 (1960).
3. * * * *Klinisches Labor.* 11 Auflage der Medizinische Chemischen Untersuchungen Methoden, Merck, Darmstadt (1970).
4. Jendrazick-Kleghorn în *Medizinische Chemie*, München-Berlin-Wien, Ed. Urban u. Schwarzenberg (1957), K. Hinsberg u. K. Lang
5. A. A. Arianoff, J. Heremans, Acta Gastroent., Belg., **30**, 387 (1967).
6. I. Apostolescu, A. Pappo, D. Motomancea, M. Zamfirescu-Gheorghiu, St. Cerc. Med. Int., **8**, 83 (1967).

7. A. Pappo, I. Apostolescu, M. Zamfirescu-Gheorghiu, Acta Gastroent., Belg., **29**, 949 (1966).
8. F. Nakayama, M. Oishi, N. Sakaguchi, H. Miyake, Clin. Chim. Acta, **10**, 544 (1964).
9. L. J. Morris în *Metabolism and Physiological Significance of Lipids* (1963), London, New York, Sydney, Ed. R.M.C. Dawson, Douglas, N. Rhodos.
10. P. Coeur, R. Creyssel, Rev. franç, d'Études Clin. et Biol., **X**, 852 (1965).
11. R. Ciupe, I. Funduc, D. Tăpălagă, St. cerc. bioch., **21** (1978).
12. I. Funduc, R. Ciupe, E. Făgărășan, St. cerc. bioch., **22** (1979) (în acest volum)
13. I. Apostolescu, A. Pappo, C. Vlădescu, D. Motomancea, M. Zamfirescu Gheorghiu, St. Cerc. Med. Int., **9**, 539 (1968).
14. I. Apostolescu, A. Pappo, C. Vlădescu, D. Motomancea, M. Zamfirescu Gheorghiu, Rev. Roum. Méd. Int., **5**, 363 (1968).
15. A. Pappo, I. Apostolescu, M. Rădulescu. M. Zamfirescu Gheorghiu, Rev. Roum. Méd. Int., **5**, 179 (1968).
16. A. Pappo, I. Funduc, M. Rădulescu, M. Zamfirescu Gheorghiu, Rev. Roum. Méd. Int., **7**, 25 (1970).
17. A. Pappo, I. Funduc, D. Motomancea, Rev. Roum. Méd. Int., **7**, 117 (1970).
18. A. Arianoff, Acta Gastr. Belg., **29**, 733 (1966).
19. W. Vander Linden, A. Norman, Acta Chir. Scand., **133**, 307 (1967).
20. R. P. Cook, în *Cholesterol, chemistry, biochemistry and pathology*, N.Y. Academic Press Inc., 1958.
21. E. Soru, în *Biochimie medicală*, vol. I, Ed. Med. București, 1963.
22. J. C. Hauton, C. Greussard, M. J. Drap, H. Sarles, Arch. Mal. Appar. Dig., **54**, 229 (1965).
23. I. S. Russel, A. Fleck, W. Burnett, Clin. Chim. Acta, **10**, 210 (1964).
24. E. H. Guldhammer, K. Kjeldsen, Acta Chir. Scand., **133**, 483 (1967).
25. R. G. De Palma, C. A. Hubay, S. Levey, J.A.M.A., **195**, 943 (1966).
26. J. L. Gilleland, J. H. Gast, B. Halpert, Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y., **94**, 118 (1957).
27. I. A. D. Bouchier, S. R. Cooperband, B. M. El Kodsi, Gastroent., **49**, 343 (1965).

CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A UNUI PREPARAT IMOBILIZAT DE L-ALANIN-2-OXOGLUTARAT AMINOTRANSFERAZĂ DIN FICAT DE ŞOBOLAN

H. D. SCHELL, OFELIA GOZIA

Rezumat. Prin legarea covalentă de gel perlat de agaroză reticulată, activată cu BrCN a L-alanin-2-oxoglutarat aminotransferazei (EC 2.6.1.2) din ficat de şobolan se obţine un preparat enzimatic insolubil cu o activitate reziduală de 26%. Prin imobilizare, enzima studiată nu-şi modifică pH-ul ei optim de acţiune şi devine mai stabilă faţă de variaţii de pH, temperatură şi concentraţie de substrat în comparaţie cu enzima liberă, nelegată. Enzima imobilizată îşi păstrează practic nealterate proprietăţile ei catalitice după o păstrare de 4 luni la temperatura de 4—5°C.

Aminotransferazele sînt enzime cu un rol important în desfăşurarea normală a proceselor metabolice din organismele vii. Ele fac legătura între cele trei metabolisme fundamentale: proteic, lipidic şi glucidic. Aceste enzime catalizează transferul grupării aminice de pe un α-aminoacid pe un α-cetoacid cu formarea unui nou α-aminoacid. Dintre aceste enzime un loc de seamă îl ocupă L-alanin-2-oxoglutarat aminotransferaza (EC 2.6.1.2) cunoscută şi sub denumirea de glutamat-piruvat transaminaza (GPT) care catalizează transferul grupării aminice de pe L-alanină pe acidul α-cetoglutaric cu formarea acidului L-glutamic.

L-alanin-2-oxoglutarat aminotransferaza există sub două forme izoenzimatice distincte, separabile electroforetic, cu localizare citoplasmatică şi mitocondrială (1) (2).

Studiul acestei transaminaze prezintă interes, mai ales în clinica medicală pentru diagnosticarea precoce a unor afecţiuni ale ţesutului hepatic şi miocardului.

Fiind bine cunoscut faptul că, enzimele prin imobilizare dobîndesc o serie de proprietăţi noi, mai avantajoase faţă de enzimele libere, ca de pildă o stabilitate mai mare faţă de temperatură şi de pH, faţă de inhibitori şi de modificări ale concentraţiei de substrat şi că enzimele imobilizate pot prezenta modele experimentale reuşite, pentru studiul diferitelor aspecte legate de mecanismul de acţiune al enzimelor în condiţii mai apropiate de cele existente *in vivo*, ne-am propus în lucrarea de faţă să realizăm un preparat imobilizat de L-alanin-2-oxoglutarat aminotransferază şi să studiem comparativ o serie de parametri fizico-chimici ai enzimei în stare legată faţă de cea liberă, nelegată.

St. cerc. biochim., 22, 2, 187—193 (1979)

MATERIAL ŞI METODE

Extracţia enzimei. Drept sursă de enzimă am folosit ficat de şobolan care a fost prelevat imediat după sacrificare şi imersat într-o soluţie fiziologică rece, pentru îndepărtarea urmelor de sînge. S-au cîntărit apoi 20 g care au fost omogenate în continuare într-un omogenizator de tip Potter, în sucroză 250 mM conţinînd 10 mM β-mercaptoetanol, raportul de extracţie fiind de 7 ml soluţie de extracţie la 1 g ţesut hepatic. Extracţia a fost efectuată timp de 60 min la o temperatură de 4°C.

Izolarea L-alanin-2-oxoglutarat aminotransferazei. Omogenatul obţinut a fost centrifugat la 14 000 t/min timp de 30 min. Supernatantul obţinut a fost apoi încălzit timp de 5 min sub agitare pe o baie de apă la 55°C şi după aceea extractul a fost răcit şi adus la pH 5,5 cu acid acetic diluat. Proteinele denaturate au fost înlăturate prin centrifugare la 14 000 t/min timp de 30 min. Supernatantului rezultat i s-au adăugat apoi sub agitare 275 mg/ml de sulfat de amoniu. Precipitatul format a fost separat prin centrifugare şi dizolvat într-un volum minim de tampon fosfat de potasiu 10 mM, pH 5,7, conţinînd şi 10 mM β-mercaptoetanol. Soluţia enzimatică a fost dializată faţă de acelaşi tampon pînă ce dializatul nu a mai dat precipitat cu o soluţie de clorură de bariu. Preparatul enzimatic dializat a fost cromatografiat pe o coloană de DEAE-celuloză (32×2,4 cm) echilibrat în prealabil cu un tampon fosfat 10 mM, pH 5,7, conţinînd şi 10 mM β-mercaptoetanol. Eluţia enzimei s-a realizat cu tampon fosfat de potasiu 10 mM, pH 5,7, ce a conţinut 25 mM sulfat de sodiu. După obţinerea diagramei de activitate enzimatică conţinutul eprubetelor cu activitate enzimatică a fost colectat şi precipitat cu sulfat de amoniu solid (300 mg/ml). Precipitatul fin rezultat conţinînd enzima, a fost separat prin centrifugare timp de 60 min, la 15 000 t/min dizolvat într-un volum mic de tampon fosfat de potasiu 40 mM, pH 7,3, conţinînd şi 10 mM β-mercaptoetanol şi dializat faţă de acelaşi tampon (3) (4) (5).

Imobilizarea L-alanin-2-oxoglutarat aminotransferazei prin legarea covalentă de agaroză activată cu BrCN. Peste 10 ml agaroză perlată, legată încrucişată (8) şi activată cu BrCN după indicaţiile date de Axen şi colab. (7) se adaugă 2,5 mg de L-alanin-2-oxoglutarat aminotransferază cuprinse în 5 ml de $NaHCO_3$ N/10, lăsînd amestecul de reacţie apoi la temperatura camerei pînă a doua zi. Produsul de reacţie rezultat este spălat alternativ cu apă distilată şi soluţie de NaCl 0,5 M, pînă la îndepărtarea completă a enzimei nelegate. În final, gelul enzimatic rezultat este suspendat în tampon fosfat 100 mM, pH 7,4 şi păstrat la 3—4°C pînă la folosire.

Determinarea concentraţiei proteice s-a făcut prin metoda Lowry modificată de Miller (8) în cazul enzimei libere, iar cantitatea de enzimă legată de suportul insolubil s-a determinat prin Kjeldahlizare.

Determinarea activităţii enzimatice s-a făcut după metoda Reitman şi Frankel (9) cu 2,4-dinitrofenilhidrazină, folosind în cazul enzimei imobilizate cîte 0,05 ml gel anzimatic în probă. Activitatea enzimei a fost exprimată în μmoli piruvat/min/mg proteină la 37°C.

Activitatea enzimatică în funcţie de pH s-a urmărit în tampon fosfat 100 mM la următoarele valori de pH : 5,5 ; 6,5 ; 7,5 ; 8,5 ; 9,5 ; 10,5.

Efectul temperaturii asupra activităţii enzimatice s-a determinat urmărind desfăşurarea reacţiei la +5°, 15°, +25°, +35°, +45°, +55°, +65° şi +75°C. Termostabilitatea celor două forme enzimatice s-a urmărit prin preincubarea lor timp de 5, 15, 30 şi 60 min la 55° şi 75°C, determinînd apoi activitatea enzimatică la 37°C.

Efectul concentraţiilor de substrat. Activitatea enzimatică în funcţie de concentraţiile de substrat a fost urmărită cu ambele substrate ale enzimei şi anume : D,L-alanină, respectiv acid α-cetoglutaric, variind concentraţia unuia dintre substrate şi menţinînd-o constantă pe cealaltă. Astfel, s-a lucrat cu D,L-alanină 50, 100, 200, 400, respectiv 600 mM şi acid α-cetoglutaric 2 mM, precum şi cu α-cetoglutaric 1, 2, 4, respectiv 6 mM şi D,L-alanină 200 mM.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Prin cuplarea covalentă a L-alanin-2-oxoglutarat aminotransferazei de agaroză activată cu BrCN se obţine un preparat enzimatic insolubil cu activitate reziduală de 26% şi un conţinut proteic de 0,33 mg/ml gel.

În figura 1 se prezintă influenţa pH-ului asupra activităţii L-alanin-2-oxoglutarat aminotransferazei libere şi imobilizate. Se constată

că enzima imobilizată prezintă o remarcabilă rezistență la variații de pH. Astfel, în timp ce enzima liberă este complet inactivată la un pH de 5,5, enzima imobilizată mai prezintă în aceste condiții încă 66% din activitatea ei maximă. O remarcă similară poate fi făcută și în cazul pH-ului de 10,5, unde enzima imobilizată este mai activă decît cea liberă. Sub-

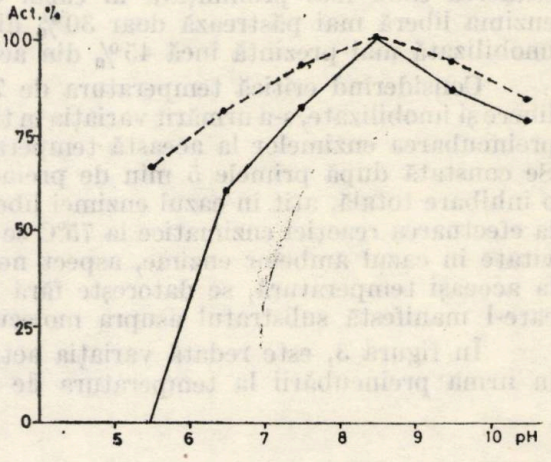


Fig. 1. — Influența pH-ului asupra activității L-alanin-2-oxoglutarat aminotransferazei libere (·———·) și legate (·····).

liniem de asemenea faptul că prin imobilizare enzima nu-și modifică pH-ul ei optim de acțiune, ambele forme ale enzimei prezentînd un maxim de activitate situat la pH 8,5.

În figura 2, este prezentată influența diferitelor temperaturi asupra activității catalitice a enzimei libere și legate a enzimei.

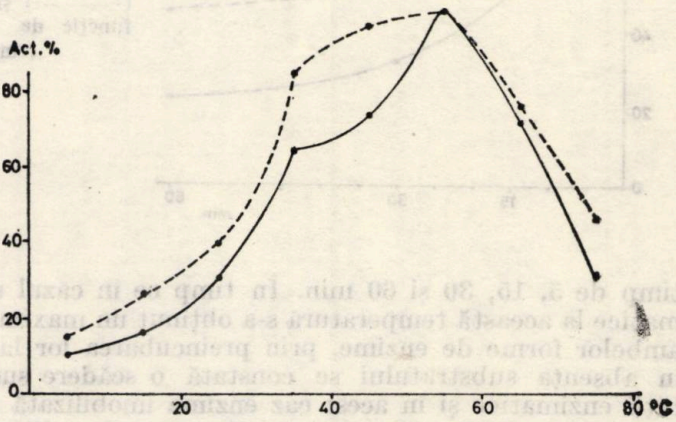


Fig. 2. — Variația activității enzimatice a L-alanin-2-oxoglutarat aminotransferazei libere (·———·) și imobilizate (·····) în funcție de temperatura de reacție.

În cazul ambelor forme enzimatice s-a urmărit reacția la următoarele temperaturi: 5°, 15°, 25°, 35°, 45°, 55°, 65° și 75°C. Astfel, se constată la temperaturile de 5°, 15°, 25° și inclusiv 35°C o comportare asemănătoare a enzimei libere și imobilizate, activitatea enzimatică crescînd

odată cu temperatura. Valorile Q_{10} determinate în intervalul 25°, 35°C sînt de asemenea asemănătoare : 2,12 în cazul enzimei libere, respectiv 2,06 în cazul enzimei legate. Şi după temperatura de 35°C se constată o creştere a activităţii enzimatice în cazul ambelor enzime care nu mai este însă paralelă dar care atinge un maxim situat la aceeaşi temperatură de 55°C. După această temperatură activitatea ambelor enzime scade, scăderea fiind mai pronunţată în cazul enzimei libere. Astfel, la 75°C enzima liberă mai păstrează doar 30% din activitate, în timp ce enzima imobilizată mai prezintă încă 45% din activitatea ei maximă.

Considerînd critică temperatura de 75°C pentru activitatea enzimei libere şi imobilizate, s-a urmărit variaţia în timp a activităţii enzimatice prin preincubarea enzimelor la această temperatură timp de 5, 15, 30 şi 60 min. Se constată după primele 5 min de preincubare la această temperatură o inhibare totală, atît în cazul enzimei libere cît şi imobilizate. Faptul că la efectuarea reacţiei enzimatice la 75°C se observă totuşi o anumită activitate în cazul ambelor enzime, aspect neremarcat în cazul preincubării la aceeaşi temperatură, se datoreşte fără îndoială efectului protector pe care-l manifestă substratul asupra moleculei enzimatice.

În figura 3, este redată variaţia activităţii enzimei libere şi legate în urma preincubării la temperatura de 55°C, în absenţa substratului,

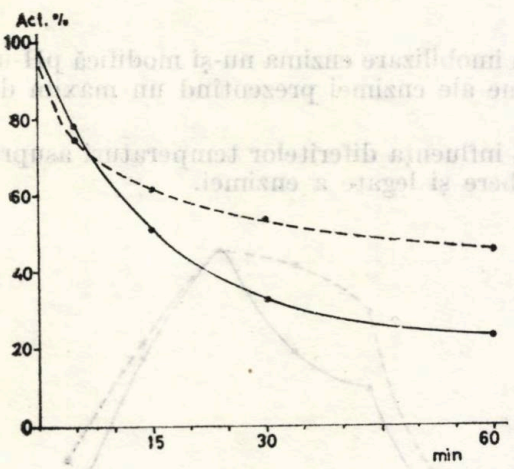


Fig. 3. — Variaţia activităţii L-alanin-2-oxoglutarat aminotransferazei libere (·———·) şi imobilizate (·····) în funcţie de durata de preincubare la temperatura de 55°C.

timp de 5, 15, 30 şi 60 min. În timp ce în cazul efectuării reacţiei enzimatice la această temperatură s-a obţinut un maxim de activitate în cazul ambelor forme de enzime, prin preincubarea lor la această temperatură în absenţa substratului se constată o scădere surprinzătoare a activităţii enzimatice şi în acest caz enzima imobilizată manifestînd o stabilitate mai mare în timp comparativ cu enzima liberă. Astfel, în timp ce enzima liberă mai prezintă după 60 min de preincubare doar 20% din activitatea ei maximă, enzima imobilizată păstrează în aceste condiţii încă 50% din activitatea ei iniţială. Activitatea enzimatică totuşi atît de crescută în cazul efectuării reacţiei enzimatice la temperatura de 55°C

se datorește desigur și în acest caz, efectului protector pe care-l are substratul din amestecul de reacție asupra enzimei.

În figura 4, sînt prezentate activitățile L-alanin-2-oxoglutarat aminotransferazei libere și imobilizate în funcție de diferite concentrații de D,L-alanină. Variația activităților specifice ale enzimei libere și imobilizate la diferite concentrații de D,L-alanină este asemănătoare și reprezentată printr-o curbă clasică Michaelis-Menten.

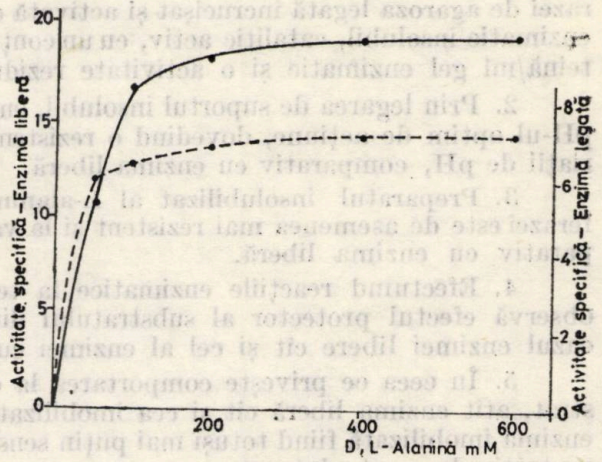


Fig. 4. — Efectul concentrației de D,L-alanină asupra activității L-alanin-2-oxoglutarat aminotransferazei libere (·————·) și imobilizate (·····).

În figura 5 sînt prezentate activitățile L-alanin-2-oxoglutarat aminotransferazei libere și imobilizate în funcție de diferite concentrații de α-cetoglutarat. Aspectul curbelor activității enzimei libere și imobilizate

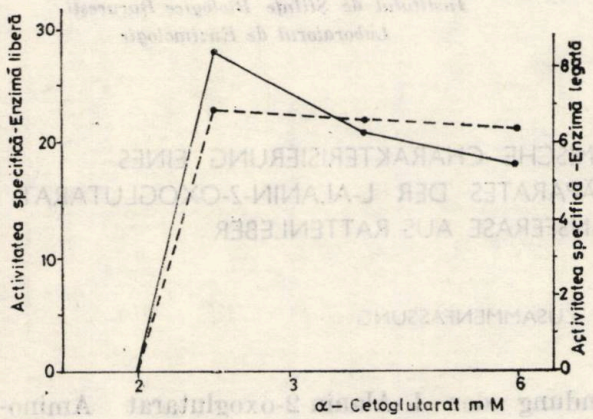


Fig. 5. — Efectul concentrației de α-cetoglutarat asupra activității L-alanin-2-oxoglutarat aminotransferazei libere (.————.) și imobilizate (— — —).

la diferite concentrații de α-cetoglutarat este și în acest caz destul de asemănător, ambele enzime prezentînd un maxim de activitate la 2 mM, urmat de o scădere a activităților enzimatice la concentrațiile de 4, respectiv 6 mM. De remarcat este faptul că enzima imobilizată este mai

rezistentă la concentraţiile de 4, respectiv 6 mM decît cea liberă, prezentînd o scădere procentuală mult mai mică a activităţii ei (4,5%) în comparaţie cu cea liberă (35%).

CONCLUZII

1. Prin legarea covalentă a L-alanin-2-oxoglutarat aminotransferazei de agaroza legată încrucişat şi activată cu BrCN rezultă un preparat enzimatic insolubil, catalitic activ, cu un conţinut proteic de 0,33 mg proteină/ml gel enzimatic şi o activitate reziduală de 26%.

2. Prin legarea de suportul insolubil, enzima studiată nu-şi modifică pH-ul optim de acţiune, dovedind o rezistenţă mult mai crescută la variaţii de pH, comparativ cu enzima liberă.

3. Preparatul insolubilizat al L-alanin-2-oxoglutarat amino-transferazei este de asemenea mai rezistent şi la variaţii de temperatură, comparativ cu enzima liberă.

4. Efectuînd reacţiile enzimatice la temperaturi mai crescute, se observă efectul protector al substratului din mediul de reacţie atît în cazul enzimei libere cît şi cel al enzimei cuplate de suportul insolubil.

5. În ceea ce priveşte comportarea la diferite concentraţii de substrat, atît enzima liberă cît şi cea imobilizată, se comportă asemănător, enzima imobilizată fiind totuşi mai puţin sensibilă la variaţii mari de concentraţie de α-cetoglutarat.

6. Preparatul imobilizat obţinut nu prezintă modificări ale activităţii enzimatice după o păstrare timp de 4 luni de zile la 4—5°C.

Prezentat la redacţie
la 21 decembrie 1978

Institutul de Ştiinţe Biologice Bucureşti
Laboratorul de Enzimologie

PHYSIKALISCH-CHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG EINES TRÄGERGEBUNDENEN PRÄPARATES DER L-ALANIN-2-OXOGLUTARAT AMINOTRANSFERASE AUS RATTENLEBER

ZUSAMMENFASSUNG

Durch kovalente Bindung der L-Alanin-2-oxoglutarat Aminotransferase (EC 2.6.1.2) aus Rattenleber an perlförmiges Gel BrCN-aktivierter vernetzter Agarose wurde ein unlösliches Enzympräparat mit 26% Restaktivität erhalten. Durch die Immobilisierung verändert das untersuchte Enzym sein pH-Optium nicht und erhält im Vergleich zum freien, nichtgebundenen Enzym eine größere Beständigkeit gegenüber

Schwankungen des pH-Wertes, der Temperatur und der Substratkonzentrationen. Das trägergebundene Enzym behält seine katalytischen Eigenschaften nach 4 Monaten Aufbewahrung bei 4—5°C unverändert bei.

BIBLIOGRAFIE

1. B. S. Hartley, Ann. Rev. Biochem., *29*, 53 (1960).
2. R. J. Foster, J. Biol. Chem., *236*, 2461 (1961).
3. P. W. Gatehous, Sarah Hopper, Lillian Schatz, H. L. Segal, J. Biol. Chem., *242*, 2319 (1967).
4. H. L. Segal, Diana S. Beattie, Sarah Hopper, J. Biol. Chem., *237*, 1914 (1962).
5. M. H. Saer, Jr., W. Terry, Jenkins, J. Biol. Chem., *242*, 91 (1967).
6. H. D. Schell, T. Benţia, M. A. Mateescu, Brevet românesc nr. 65382/1977.
7. R. Axen, J. Porath, S. Ernbach, Nature, *214*, 1302 (1967).
8. G. L. Miller, Anal. Chem., *31*, 964 (1959).
9. S. Reitman, S. Frankel, Am. J. Clin. Path., *28*, 56 (1956).

DOZAREA RADIOIMUNOLOGICĂ A 17-β-ESTRADIOLULUI ŞI PROGESTERONULUI DIN SÎNGELE GĂINILOR OUĂTOARE ÎNTREŢINUTE ÎN ADĂPOSTURI CU REGIM DE LUMINĂ DIFERIT

N. STĂNCIOIU, SIMONA CEAUŞESCU

Rezumat. S-a dozat radioimunologic 17-β-estradiolul şi progesteronul din sîngele găinilor ouătoare de rasă Leghorn, întreţinute în adăposturi cu regimul de lumină diferit (16 ore/zi-lot I şi 9 ore/zi-lot II). Rezultatele obţinute arată că concentraţia estradiolului este mai mare la găinile din lotul I, faţă de cele din lotul II. Nivelul progesteronului nu prezintă diferenţă mare între cele două loturi.

Cercetări recente, efectuate pe păsări şi animale, au evidenţiat relaţia strînsă între lumină şi activitatea gonadelor, hipofizei şi hipotalamusului. Astfel, Ash W. J. şi colab. (1) au dovedit că fotoperiodismul influenţează apariţia maturităţii sexuale şi condiţionează ritmul ovulator la păsări. Ţahaev A.G. (2), efectuînd cercetări pe găini (*Gallus domesticus*), arată că regimul de lumină influenţează producţia de ouă. Rosemary C.B. şi colab. (3) testează radioimunologic nivelul LH şi progesteronului şi găseşte că nivelul lor creşte cu 4—7 ore înainte de ovulaţie. Stimulaţi de aceste observaţii, în lucrarea de faţă ne-am propus să cercetăm nivelul estradiolului şi progesteronului în funcţie de regimul de lumină la găinile ouătoare.

MATERIAL ŞI METODĂ

Cercetările au fost efectuate pe un număr de 50 găini ouătoare de rasă Leghorn în vîrstă de 45 săptămîni. Păsările au fost întreţinute în aceleaşi condiţii ($t° = 22{,}5°C$; umiditatea 65 %), în hale „oarbe" luminate artificial cu becuri cu incandescenţă, în baterii pe două nivele, cu o densitate de 17 găini/m² şi au fost hrănite cu furaj combinat administrat la discreţie. Un număr de 25 găini proveneau dintr-o hală cu efectivul de 9 500 capete şi producţia medie pe 6 luni de 134,5 ouă/cap de găină furajată şi cu regimul de lumină de 16 ore/zi (lot I), iar celelalte 25 găini proveneau dintr-o hală cu un efectiv de 12 766, cu producţia de 128,9 ouă/găină şi regimul de lumină de 9 ore/zi (lot II).

De la găinile celor două loturi s-a recoltat sînge din vena axilară şi din serul exprimat după coagulare s-a dozat 17-β-estradiolul şi progesteronul folosind metoda radioimunologică. Estradiolul a fost dozat după metoda descrisă de firma CEA-IRE-SORIN, ce a însoţit echipamentul radioimunologic folosit. Metoda radioimunologică de dozare a progesteronului se bazează pe procedeul descris de Abraham şi colab. (4) şi Kutas şi colab. (5). Dozările au fost efectuate în laboratoarele de hormonologie şi de izotopi radioactivi ale Institutului de endocrinologie „C. I. Parhon", Bucureşti.

St. cerc. biochim, 22, 2, 195—197 (1979)

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În figura 1 prezentăm valorile medii ale concentrației 17-β-estradiolului. Se observă că la găinile din lotul I concentrația estradiolului a fost mai mare decît la cele din lotul II (26,17 ± 1,1 ng/ml față de 21,00 ± 1,2 ng/ml). Este posibil ca această diferență să se datoreze regimului de lumină diferit, întrucît, se știe, că lumina sensibilizează hipotalamusul și neurosecrețiile acestuia (FSH și LH) se acumulează în hipofiza anterioară și apoi pe calea sîngelui ajung la gonade stimulînd secreția de estradiol a acestora (6, 7).

În figura 2 prezentăm valorile medii ale concentrației de progesteron. Se constată că diferența de concentrație între cele două loturi este foarte

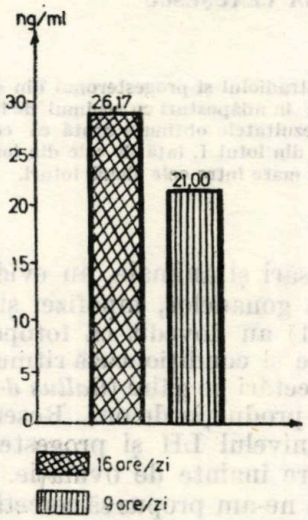


Fig. 1. — Nivelul 17-β-estradiolului din sîngele găinilor ouătoare.

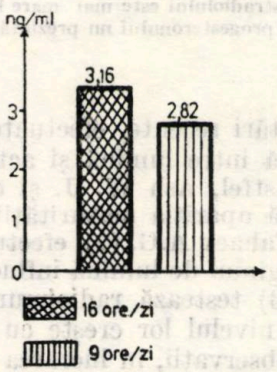


Fig. 2. — Nivelul progesteronului din sîngele găinilor ouătoare.

mică (3,16 ± 0,3 ng/ml față de 2,82 ± 0,2 ng/ml). Această apropiere s-ar datora faptului că progesteronul sanguin, în afară de ovar, poate să apară și ca rezultat al metabolizării hormonilor corticosuprarenalei, el însuși avînd un grad mare de metabolizare (8, 9). Or, în condițiile creșterii industriale a păsărilor, cînd stressul este mai intens apare în sîngele păsărilor o cantitate mai mare de progesteron de proveniență corticosuprarenală.

CONCLUZII

1. Concentrația 17-β-estradiolului este mai mare în sîngele găinilor ouătoare întreținute în hale cu regim de lumină de 16 ore/zi, față de cele întreținute în hale cu regim de lumină de 9 ore/zi.

2. Concentrația progesteronului sanguin nu a prezentat diferențe semnificative între loturile de găini întreținute în hale cu regim de lumină diferit.

Prezentat la redacție
la 16 aprilie 1979

Facultatea de Medicină Veterinară, București
Disciplina de Fiziologie animală;
Facultatea de Biologie, București
Disciplina de Biochimie

THE RADIOIMMUNOLOGICAL DOSING OF 17-β-OESTRADIOL AND PROGESTERONE IN LAYERS'BLOOD KEPT IN HOUSES WITH DIFFERENT LIGHT CONDITIONS

SUMMARY

17-β-Oestradiol and Progesterone were radioimmunologically dosed in the blood of Leghorn layers kept in houses with different light conditions (16 hours/day — lot one and 9 hours/day — lot two). It was found that oestradiol concentration was higher in hens under light conditions of 16 hours/day as compared to those of 9 hours/day. The level of progesterone showed significant differences between the two lots.

BIBLIOGRAFIE

1. W. J. Ash, L. L. Hulbert, Arch. Geflugelz. Kleintierk., **19**, 169 (1970).
2. A. G. Tahaev, *Voprosî sravnitelinoi i vozrastnoi endocrinologhii*, Ed. „Moslas", Vilnius (1976).
3. C. B. Rosemary, Veter. Rec., **92**, 76 (1973).
4. G. E. Abraham, R. Swerdloff, D. Tulchinsky, W. D. Odel, T. clin. Gene. Endocr., **32**, 619 (1971).
5. M. Kutas, A. Chung, D. Bartos, A. Castro, Steroids, **20**, 698 (1972).
6. J. D. Bray, Poult. Dig. SUA, **29**, 336, 65 (1970).
7. N. Stăncioiu, Bazele fiziologice ale sporirii producţiei de ouă, Ed. Ceres, Bucureşti, 66 (1979).
8. O. Adamec, M. Feleginová, J. Kollár, Vedeké Práce hydinarstvo, *10*, CSSR, 133 (1971).
9. M. Feleginová, O. Adamec, Vedeké Práce hydinarstvo, *10*, CSSR, 125 (1971).

EFECTUL NATURII ŞI CANTITĂŢII REZIDUURILOR DE ERBICIDE ASUPRA INDICILOR BIOCHIMICI DE CALITATE LA UNELE SOIURI DE MERE

M. ŞERBAN*), AURICA CARAMETE**), LIDIA RĂDULESCU***), EVA DIACONESCU **), DOMNICA RUGHINIŞ**)

Rezumat. În livezile de meri pe rod, s-a studiat eficacitatea unor erbicide triazinice, ureice şi fenoxiacetice şi influenţa reziduurilor lor asupra calităţii fructelor. Simazinul a distrus cele mai multe buruieni; variantele tratate cu acest produs au dat cele mai însemnate sporuri de recoltă. Reziduurile de erbicide triazinice din fructe au fost în limite admise. Rezultatele privind compoziţia chimică a fructelor arată că erbicidele aplicate au avut ca urmare micşorarea conţinutului în substanţă uscată, cenuşă şi pectine. Conţinutul în acid ascorbic s-a mărit în urma administrării simazinului terbumetonului şi s-a micşorat în cazul tratamentului cu atrazin. Linuronul nu modifică compoziţia chimică a fructelor, cu toate că reziduurile sale prezintă cele mai mari valori.

În scopul obţinerii unor recolte mai mari şi de bună calitate, se intervine în sensul realizării unor condiţii cît mai favorabile creşterii şi dezvoltării culturilor. Administrarea îngrăşămintelor constituie un principal mijloc prin care se asigură formarea recoltei planificate, însă apa şi substanţele nutritive sînt absorbite nu numai de culturi ci şi de buruieni care, în aceste condiţii, invadează solul în aşa grad încît măsurile agrotehnice devin insuficiente pentru combaterea lor şi se recurge la aplicarea erbicidelor. Acestea, împreună cu apa şi substanţele nutritive pătrund atît în buruieni, cît şi în plantele cultivate, eficacitatea, selectivitatea şi fitotoxicitatea lor constînd în viteza diferită de absorbţie şi translocaţie, de modul în care intervin în metabolismul plantelor, de gradul şi viteza de inactivare care depind pe de o parte de structura chimică, doza şi epoca de administrare a erbicidului şi, pe de altă parte, de particularităţile metabolice ale speciilor de cultură (1).

Practica utilizării erbicidelor a demonstrat că acestea influenţează într-un sens sau altul mărimea recoltei şi calitatea ei. În acest context, între anii 1974—1978 s-au efectuat cercetări referitoare la eficacitatea unor erbicide sistemice pentru combaterea buruienilor din livezile de meri pe rod şi felul în care acestea modifică compoziţia fructelor.

MATERIAL ŞI METODE

Pe solul brun acid de la Staţiunea de cercetări pomicole Bilceşti s-au experimentat erbicide triazinice (atrazin, 2,-clor-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazină, simazin-2-clor-4,6-di(etilamino)-1,3,5-triazină, terbumeton-2-tertbutilamino-4-etilamino-6-metoxi-1,3,5-triazină), ureice (linuron-3-(3,4-diclorfenil)-1-metoxi-1-metil-uree) şi fenoxiacetice clorurate

2,4,5-T-acidul 2,4,5-triclorfenoxiacetic), administrate preemergent şi postemergent în scopul stabilirii influenţei lor asupra mărimii şi calităţii recoltei, ca urmare a eficacităţii în combaterea buruienilor. Experienţele organizate — în blocuri — în patru repetiţii cu cîte doi pomi la o repetiţie, s-au efectuat pe soiurile Kaltherer Böhmer şi Wagner Premiat altoit pe M 11 în vîrstă de 9 şi respectiv 12 ani.

În timpul perioadei de vegetaţie s-au efectuat observaţii şi măsurători privind eficacitatea tratamentelor şi aprecierea gradului de îmburuienare pe baza sării EWRC. La maturitatea de recoltare, s-a înregistrat producţia absolută şi relativă pe variante şi repetiţii şi s-a determinat în fructe conţinutul substanţei uscate, cenuşa, proteina brută, glucide totale şi direct reducătoare, aciditatea şi conţinutul în acid ascorbic după metode cunoscute (2). După o perioadă de păstrare de 2—3 luni, s-au determinat prin cromatografie în strat subţire reziduurile de erbicide triazinice şi fenoxiacetice clorurate şi spectrofotometric reziduurile iniţiale şi totale de erbicide ureice (3,4).

Rezultatele s-au interpretat comparativ cu doi martori: martor netratat şi nelucrat (îmburuienat şi martor prăşit de 4 ori (clasic).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În toţi anii de experienţă, s-a remarcat eficacitatea simazinului sub diferite forme de condiţionare, linuronul şi terbumetonul avînd o eficacitate mai mică (la doze de 3—4 kg/ha, parcelele experimentale prezintă un grad de îmburuienare egal cu martorul netratat şi nelucrat). Nu în toate cazurile însă distrugerea buruienilor pe cale chimică a avut drept rezultat sporirea producţiei; comparativ cu martorul prăşit, numai la 10 variante din 33 s-au realizat sporuri medii de 6—8 t/ha asigurate statistic.

Soiul Wagner Premiat are un potenţial productiv superior soiului Kaltherer Böhmer dar, la ambele soiuri, se remarcă din punct de vedere al producţiei aceleaşi efecte: simazin EC 2,5—5 kg/ha, simazin + roundup 2,5—5 kg/ha şi amizin 2—5 kg/ha.

Producţiile medii înregistrate în anii experimentali, atestă influenţa depresivă a erbicidelor la ambele soiuri, cu toate că valorile medii de buruieni exprimate în g masă verde/m^2 scad de la 236—710 g în al doilea an, la 13—41 g în al cincilea.

Reziduurile de erbicide din fructele analizate după o perioadă de păstrare de 2—3 luni prezintă valori de 0,01—0,82 ppm; în majoritatea probelor, reziduurile sînt de 0,02 ppm şi numai în cazul administrării afalonului (linuron) fructele conţin reziduuri mai mari. În fruct, linuronul este degradat în proporţie de circa 20%, reziduurile iniţiale fiind de 0,72—0,82 ppm, direct proporţionale cu doza administrată.

În cazul triazinelor, valorile reziduale nu ridică probleme toxicologice; dar, prezenţa lor atestă absorbţia radiculară şi translocaţia pînă la nivelul coroanei. Micile diferenţe ale valorilor reziduale se reflectă în nivelul producţiei; probele în care s-au constatat cele mai mari cantităţi de reziduuri de triazine proveneau din variantele la care s-a înregistrat cea mai accentuată micşorare a producţiei comparativ cu martorul prăşit. Deoarece întreaga suprafaţă experimentală a avut acelaşi potenţial de fertilitate, dozele de îngrăşăminte minerale fiind uniforme, atribuim diferenţele de producţie intervenţiei erbicidelor.

Rezultatele privind compoziţia chimică a fructelor arată că erbicidele studiate modifică o serie întreagă de indici. Astfel, administrarea compuşilor triazinici, ureici şi fenoxiacetici clorurati a avut ca urmare

Tabela 1

Eficacitatea tratamentelor cu erbicide în livada de meri Kaltherer Böhmer

Tratament	Mom. adm.	Doză s.a. kg/ha	Producția			Buruieni kg/m²			Aprecierepe scara EWRC
			kg/ pom	t/ha	%	monocotile donate	dicotiledonate	total	
martor, netratat, nelucrat	—	—	29,2	24,3	100,0	0,30	1,82	2,12	9,0
martor prășit de 4 ori	—	—	54,5	45,5	186,6	0,10	0,15	0,25	1,8
simazin caragard 3587	preem. postem.	5 5	36,6	25,6	125,3	—	0,38	0,38	2,0
saminol	preem. postem.	5 2,5	40,6	33,8	139,0	—	0,13	0,13	1,0
buvinol	preem.	7	17,6	14,3	60,3	—	0,52	0,52	3,2
buvinol	,,	9	29,5	24,6	101,0	—	0,26	0,26	1,8
caragard 3587	,,	4	48,3	40,2	165,0	0,01	1,38	1,39	8,0
caragard 3587	,,	6	55,7	47,4	190,8	—	0,40	0,40	2,0
livezin A	,,	6	36,0	30,0	125,0	0,08	0,11	0,19	1,2
livezin C	,,	6	37,0	30,8	136,0	0,012	0,16	0,28	1,9
afalon	,,	3	51,3	42,7	175,7	—	2,32	2,32	9,0
afalon	,,	4	51,5	42,6	175,0	0,01	0,32	0,33	2,0
DL 5% = 17,6%; DL 1% = 23,6%; DL 0,1% = 30,8%									
martor păășit de 4 ori	—	—	22,0	18,3	100,0	—	—	—	1,0
simazin Geigy	preem.	5	28,3	26,6	128,6	—	—	—	1,0
simazin rom.	,,	5	26,2	21,8	119,0	0,01	0,15	0,16	1,2
simazin EC	,,	5	44,9	37,4	204,0	0,02	0,10	0,12	1,1
simazin EC		6	30,2	25,2	137,0	0,02	0,06	0,08	1,0
simazin Geigy roundup	preem. postem.	5 3	40,0	33,3	180,0	—	—	—	1,0
simazin rom. roundup	preem. postem.	5 3	31,8	26,5	144,5	—	—	—	1,0
amizin	preem.	4	20,8	13,3	94,5	—	0,05	0,05	1,0
amizin	,,	5	41,6	34,6	189,9	—	—	—	1,0
simazin Geigy caragard	preem. postem.	5 5	29,1	24,2	132,2	—	—	—	1,0
DL 5% = 34,5%; DL 1% = 46,5%; DL 0,1% = 61,7%									

Tabela 2

Eficacitatea tratamentelor cu erbicide în livada de meri Wagner Premiat

Tratament	Mom. adm.	Doză s.a. kg/ha	Producţia			Buruieni kg/m²			Apreciere pe scara EWRC
			kg/pom	t/ha	%	monocotiledonate	dicotiledonate	total	
martor prăşit de 4 ori	—	—	42,6	35,5	100	—	—	—	1
simazin Geigy	preem.	2,5	53,2	44,3	124,9	0,006	0,012	0,018	1
simazin rom.	,,	2,5	41,6	34,6	97,6	—	—	—	1
simazin EC	,,	2,5	49,6	41,9	116,4	—	—	—	1
simazin EC	,,	3,0	40,8	34,0	95,7	0,004	0,020	0,024	1
simazin Geigy	preem.	2,5	56,0	46,6	131,4	0,005	0,035	0,040	2
roundup	postem.	1,5							
simazin rom.	preem.	2,5	52,1	43,4	122,3	0,005	0,030	0,035	2
roundup	postem.	1,5							
amizin	preem.	2,0	50,6	42,1	118,7	0,020	0,010	0,030	2
amizin	,,	2,5	30,1	25,1	70,6	—	—	—	1
simazin Geigy	preem.	2,5	46,2	38,5	108,4	—	—	—	1
caragard	postem.	2,5							
saminol	preem.	2,5	45,2	37,6	106,1	—	—	—	1
	postem.	1,2							

DL 5 % = 13,5 %; DL 1 % = 18,3 %; DL 0,1 % = 24,2 %

Tabela 3

Influenţa erbicidelor asupra producţiei de mere. Valori medii pe experienţe

Soiul	Anul exper.	Producţia t./ha	Buruieni g/m²
Kaltherer Böhmer	1975	32,6	710
Kaltherer Böhmer	1978	26,1	41
Wagner Premiat	1975	42,8	—
Wagner Premiat	1978	38,5	13

Tabela 4

Reziduuri de erbicide în mere

Soi	Tratament	Doză s.a. kg/ha	Reziduu p.p.m.						
			atrazin	simazin	terbumeton	2,4,5-T	linuron		
							total	inițial	metaboliți
Kaltherer Böhmer	simazin caragard	5 5	—	0,010	0,010	—	—	—	—
	saminol	5 2,5	—	0,006	—	—	—	—	—
	buvinol	7	0,026	—	—	0,033	—	—	—
	buvinol	9	0,01	—	—	0,033	—	—	—
	caragard	4	—	—	0,010	—	—	—	—
	caragard	6	—	—	0,010	—	—	—	—
	livezin A	6	—	—	0,010	—	—	—	—
	livezin C	6	—	—	0,003	—	—	—	—
	afalon	3	—	—	—	—	0,92	0,72	0,20
	afalon	4	—	—	—	—	1,08	0,82	0,26
	simazin Geigy	5	—	0,02	—	—	—	—	—
	simazin rom.	5	—	0,02	—	—	—	—	—
	simazin EC	5	—	0,02	—	—	—	—	—
	simazin EC	6	—	0,02	—	—	—	—	—
	simazin Geigy roundup	5 3	—	0,02	—	—	—	—	—
	simazin rom roundup	5 3	—	0,02	—	—	—	—	—
	amizin	4	—	0,02	—	—	—	—	—
	amizin	5	—	0,02	—	—	—	—	—
	simazin Geigy caragard	5 5	—	0,02	0,02	—	—	—	—
Wagner Premiat	simazin Geigy	2,5	—	0,02	—	—	—	—	—
	simazin rom.	2,5	—	0,02	—	—	—	—	—
	simazin EC	2,5	—	0,02	—	—	—	—	—
	simazin EC	3,0	—	0,02	—	—	—	—	—
	simazin Geigy roundup	2,5 — 1,5	—	0,02	—	—	—	—	—
	simazin rom. roundup	2,5 1,5	—	0,02	—	—	—	—	—
	amizin	2	—	0,02	—	—	—	—	—
	amizin	2,5	—	0,02	—	—	—	—	—
	simazin Geigay caragard	2,5 2,5	—	0,02	0,02	—	—	—	—

Tabela 5

Compoziţia chimică a fructelor

Soi	Tratament	Doză kg/ha.	subs. uscată %	ce. nuşă %	proteine brute %	Zahăr		Aciditate %	Pectine %	Acid ascorbic mg/100 g	Raport zahăr/aciditate
						total	dir. red.				
Kaltherer Böhmer	martor netratat nelucrat	—	16,14	0,21	0,38	9,18	8,35	0,61	0,40	3,00	15,04
	martor prăşit de 4 ori	—	19,83	0,29	0,41	12,39	11,78	0,38	0,48	3,20	32,60
	simazin caragard	5 5	15,08	0,22	0,32	12,83	12,14	0,41	0,41	5,10	31,29
	saminol	5 2,5	16,46	0,23	0,35	11,26	10,29	0,43	0,46	4,10	26,18
	buvinol	7	15,38	0,28	0,34	12,56	11,93	0,68	0,38	4,00	18,46
	buvinol	9	15,85	0,27	0,31	11,73	10,86	0,42	0,34	2,80	27,92
	caragard	4	17,79	0,25	0,39	11,86	10,54	0,37	0,47	4,80	29,34
	caragard	6	17,23	0,23	0,38	12,35	11,68	0,39	0,46	4,80	31,66
	livezin A	6	16,40	0,26	0,36	9,56	8,26	0,60	0,45	4,90	15,41
	livezin C	6	16,53	0,25	0,37	13,04	12,35	0,45	0,47	4,70	28,97
	afalon	3	18,49	0,23	0,39	9,23	8,43	0,40	0,49	3,70	23,07
	afalon	4	18,57	0,22	0,39	11,59	9,83	0,36	0,48	3,30	32,19
Wagner Premiat	martor prăşit de 4 ori	—	19,48	0,34	0,36	13,18	12,64	0,35	0,62	4,80	37,65
	simazin	5	17,05	0,28	0,33	13,26	12,79	0,28	0,53	5,70	47,35
	simazin rom.	5	18,14	0,27	0,32	12,11	11,68	0,29	0,48	5,20	41,72
	simazin EC	5	17,29	0,29	0,34	13,36	12,14	0,25	0,59	5,80	53,44
	simazin EC	6	16,87	0,21	0,36	13,54	12,30	0,23	0,55	5,60	58,66
	simazin roundup	5 3	17,56	0,23	0,37	13,69	12,74	0,25	0,57	5,50	54,76
	simazin rom. roundup	5 3	17,23	0,22	0,37	13,42	12,28	0,24	0,58	5,70	55,91
	amizin	4	16,74	0,25	0,34	12,83	12,02	0,28	0,57	5,20	45,82
	amizin	6	16,05	0,27	0,31	13,50	12,48	0,26	0,53	5,40	51,92
	simazin caragard	5 5	15,32	0,23	0,29	13,58	12,68	0,34	0,43	6,00	39,94

micşorarea conţinutului în substanţă uscată, cenuşă şi pectine în toate cazurile cercetate. Comparativ cu martorul prăşit, valorile substanţei uscate scad de la 19,48—19,83% la 15,08—17,5%, cenuşa de la 0,29—0,34% la 0,21—0,28%, iar pectinele de la 0,48—0,62% la 0,34—0,59% cu excepţia linuronului care nu influenţează această componentă.

La soiul Kaltherer Böhmer erbicidele triazinice şi fenoxiacetice clorurate au avut ca efect scăderea conţinutului în proteine cu circa 20% faţă de martor şi creşterea accentuată a aciditătii care atinge valori de 60—68%. La soiul Wagner Premiat triazinele nu au influenţat conţi-

nutul în proteină brută, însă conţinutul în acizi scade de la 0,35% la 0,29%.

La ambele soiuri cantitatea de glucide direct reducătoare nu este influenţată de prezenţa reziduurilor de erbicide; de asemenea, valorile zahărului total oscilează în limite apropiate, însă micşorarea aciditătii modifică simţitor raportul zahăr/aciditate la soiul Wagner Premiat; acest rapot la martor este de 37,65, iar la variantele erbicidate 39,94—58,86. Fructele la care acest raport are valori mari, sînt dulci şi fade.

Conţinutul în acid ascorbic s-a mărit în urma administrării simazinului şi terbumetonului pînă la valori de 4,10—6,00 mg/100 g, faţă de martori care au 3,00—4,80 mg/100 g. Atrazinul şi 2,4,5-T micşorează conţinutul în vitamină C.

Linuronul nu modifică compoziţia chimică a fructelor, cu toate că reziduurile sale prezintă cele mai mari valori.

CONCLUZII

1) Pentru combaterea buruienilor din livezile de meri pe rod, simazinul are cea mai bună eficacitate, asigurînd un spor de recoltă de 6—8 t/ha comparativ cu martorul întreţinut clasic.

2) Erbicidele administrate la sol sînt absorbite radicular şi translocate în plantă pînă la nivelul fructelor în care s-au constatat reziduuri de compuşi triazinici de 0,003—0,026 ppm, uroni 0,200—1,080 ppm şi derivaţi fenoxiacetici 0,033 ppm.

3) Tratamentele aplicate au influenţat compoziţia chimică a fructelor în sensul micşorării conţinutului în substanţă uscată, cenuşă şi pectine.

4) Cantitatea de glucide nu este influenţată de prezenţa reziduurilor de erbicide, dar în unele cazuri aciditatea scăzînd simţitor, fructele au fost dulci şi fade.

5) Conţinutul în acid ascorbic s-a mărit în urma administrării i simazinului şi terbumetonului şi s-a micşorat în cazul tratamentului cu atrazin.

6) Linuronul nu modifică compoziţia chimică a fructelor, cu toate că reziduurile sale prezintă cele mai mari valori.

Prezentat la redacţie
la 9 iunie 1979

*) *Institutul Agronomic „N. Bălcescu" — Bucureşti*
**) *Institutul de Cercetări pentru Protecţia Plantelor — Bucureşti*
***) *Staţiunea de Cercetări Pomicole Bilceşti*

THE EFFECTS OF THE NATURE AND SIZE OF HERBICIDE RESIDUES CN THE BIOCHEMICAL QUALITY INDICES OF SOME APPLE VARIETIES

SUMMARY

The effectiveness of several triazines, urea and phenoxy-acetic herbicides and the influence of their residues on fruit quality were studied in bearing apple orchards. Simazin killed the highest number of weeds ;

the variants treated with this chemical presented the highest yields. The residues of triazine herbicides in the fruits ranged between 0.003—0.026 ppm, the urones and phenoxyacetic derivatives attained 0.20—1.08 ppm and 0.033 ppm, respectively, their size being directly proportional to the rate applied. The data on the chemical composition of fruits show that the application of herbicides resulted in a decrease of the dry matter, ash and pectin content. The quantity of sugars was not affected by the presence of residues, but in some instances, due to the decreased acidity, the fruits were sweet and tasteless. The ascorbic acid content increased after the application of simazin and terbumeton, and decreased after treatments with atrazin. The chemical composition of fruits was not changed by linuron, although its residues presented peak values.

BIBLIOGRAFIE

1. L. J. Audas, *The physiology and biochemistry of herbicides*, Acad. Press U.S.A., p. 292 (1964).
2. K. Peach, N. V. Tracey, *Modern methods of plant analysis*, Berlin, 164, (1956).
3. R. Delley, K. Friederick, B. Karlhuber, G. Szehely, K. Stambach, Z. für Analyt. chemie, **228**, sep. 23 (1967).
4. G. Voss, J. A. Iuth, N. Burkhard, *Automated determination of aromatic amines derived from pesticides rezidues*, II-the Int. Contres IUPAC, Israel, 326 (1971).

FLAVONOIDELE DIN MUGURII DE PLOP

M. TĂMAŞ, I. MARINESCU şi FLORENTINA IONESCU

Rezumat. S-au studiat, prin metoda cromatografică şi spectrală în UV, flavonoidele din mugurii de plop, comparativ cu cele din propolis. S-au pus în evidenţă 19 fracţiuni, dintre care 16 sînt comune cu cele din propolis. Prin cromatografie preparativă pe strat subţire au fost izolate 12 fracţiuni, care au fost caracterizate prin spectrul de absorbţie în UV, valoare Rf şi fluorescenţă. Prin aceste analize s-au identificat chrisina, pinocembrina, acidul cafeic, acidul cinamic, acidul ferulic şi acidul benzoic. În mugurii de plop flavonoidele sînt localizate, aproape exclusiv, în secreţiile rezinoase de sub primele catafile. A fost elaborată o metodă spectrofotometrică în UV, de determinare cantitativă a flavonelor în prezenţă de $ZrOCl_2$. Prin această metodă s-a stabilit un conţinut de 8,05% flavone în mugurii de plop şi 6,42% în propolis.

Flavonoidele din mugurii de plop negru *(Gemmae Populi)* au început să atragă atenţia cercetătorilor, mai cu seamă după ce s-a descoperit originea propolisului şi faptul că în compoziţia chimică a acestuia substanţele flavonoidice reprezintă principalele componente active. Aceste cercetări sînt determinate şi de utilizarea mai frecventă a preparatelor cu propolis în terapeutică (1, 2).

În mugurii de plop au fost puse în evidenţă, apoi izolate flavonoidele : chrisină, tectochrisină, galangină, pinocembrină şi izalpinină, iar recent au fost semnalate şi alte flavonoide (3).

Cît priveşte identitatea flavonoidelor din mugurii de plop şi din propolis, Lavie (1975) (citat în (1)), consideră că sînt comune 5 flavonoide, adică cele citate mai sus. Stabilirea identităţii chimice dintre cele două produse a fost posibilă numai în urma utilizării metodei cromatografice şi spectroscopice. Prin aceste tehnici s-a reuşit să se lămurească şi principala origine a propolisului (secreţiile rezinoase din mugurii de plop, mesteacăn, pin, brad, castan ş.a.) şi totodată să se standardizeze diferite sorturi de propolis în funcţie de componenţii flavonoidici (1).

În propolis Popravko (1969) (citat în (1)), citează 18 componente dintre care 13 flavonoide, aparţinînd clasei flavoanelor, flavonolilor şi flavanonelor, alături de o terpenă (alfa-acetoxi-betulenol), izovanilină, acid benzoic, acid cinamic, acid cafeic şi acid ferulic.

Prin cromatografie uni- şi bidimensională Metzner şi colab. (4) au separat din propolis 26 fracţiuni, cărora le-a atestat, prin bioautografie (direct pe cromatogramă) acţiunea antimicrobiană şi antifungică, între care numeroase fracţiuni sînt reprezentate de flavonoide (5).

La noi în ţară există preocupări pentru cercetarea flavonoidelor din propolis, la Institutul Apimondia Bucureşti şi Facultatea de farmacie Iaşi. Astfel Derevici (2), a pus în evidenţă flavonoidele din propolis, fără însă a identifica componenţii.

Avînd în vedere că în compoziția propolisului, flavonoidele diferă în funcție de natura speciilor vegetale de pe care albinele propolizează, ne-am propus un studiu al substanțelor flavonoidice din mugurii de plop, comparativ cu cele din propolis. În cazul unei identități, sau compoziții chimice apropiate, mugurii de plop ar putea constitui o viitoare sursă de propolis.

Cunoscînd compoziția complexă a mugurilor de plop, ne-am propus să stabilim și localizarea flavonoidelor în muguri. Pe de altă parte, introducerea în terapie de noi preparate pe bază de extract de muguri de plop presupune și un studiu calitativ și cantitativ al flavonelor din mugurii de plop.

MATERIAL ȘI METODE

Am utilizat muguri de plop negru (*Populus nigra* L.) (6), recoltați înainte de deschidere și uscați la temperatura camerei. Am studiat următoarele produse :

— muguri întregi, uscați și pulverizați,
— rezina de culoare roșie portocalie, izolată de sub primele catafile,
— catafile spălate de rezină, cu metanol, la rece,
— partea centrală sau „inima" mugurelui (primordii florale și foliare),
— propolis, provenit de la ACA Cluj.

Din toate acestea am preparat soluții extractive cu alcool etilic, prin tehnica macerării la rece, avînd concentrația drog-alcool 10 : 100.

Punerea în evidență a flavonoidelor am efectuat-o, într-o primă etapă, pe aceste soluții extractive, cu reactivii de culoare citați în literatură (7, 8, 9).

Analiza calitativă a flavonoidelor am efectuat-o prin CSS de silicagel H (Merck) în sistemul toluen-acetat de etil-acid formic (5 : 3 : 1) (10). Identificarea fracțiunilor am efectuat-o la lumina UV, după revelarea cromatogramei cu NH_3, $AlCl_3$ și $ZrOCl_2$. De asemenea, pentru precizarea numărului de fracțiuni, am mai utilizat și cromatografia bidimensională pe strat subțire de silicagel (plastik-folien Merck), în sistemele I toluen-formiat de etil-acid formic 75: 24 : 1) și II cloroform-etanol (96 : 4) (4).

Izolarea fracțiunilor identificate am efectuat-o prin CSS preparativă pe silicagel H, întins în strat de 0,5 mm, pe plăci de 30 ×15 cm, aplicînd pe linia de start spoturi liniare. După developare și uscarea plăcii, au fost delimitate, sub lumina UV, 12 fracțiuni. Benzile orizontale cu silicagel au fost decupate, eluate cu etanol, iar silicagelul a fost separat prin centrifugare.

Ca substanțe de referință am aplicat pe linia de start kempferol, quercetol, acid cinamic, acid cafeic, acid ferulic, acid benzoic și chrisină.

Pentru confirmarea identității unor flavone și identificarea altora, am utilizat spectroscopia în UV, la un aparat Spekord UV—VIS. Toate fracțiunile izolate au fost diluate corespunzător în metanol absolut și a fost înregistrat spectrul de absorbție în UV, între 200—550 nm. În continuare s-a adăugat, separat, 6 pic dintr-o soluție metanolică de $AlCl_3$ 5% și respectiv 3 pic dintr-o soluție metanolică de MeONa 2,5%, pentru a înregistra maximele de absorbție în prezența acestor reactivi și compararea lor cu datele din literatură (9).

Avînd în vedere diversitatea și numărul mare al substanțelor flavonoidice din mugurii de plop, ca și din propolis, pînă în prezent nu s-au pus la punct tehnici de determinare cantitativă a lor din cele două produse. Reacția clasică cu $AlCl_3$ nu a dat rezultate satisfăcătoare. De aceea ne-am propus o determinare cantitativă spectrofotometrică în UV, pornind de

la observaţia că majoritatea flavonoidelor izolate, dau în lumina UV, o fluorescenţă puternică galben-portocalie, după revelare cu $ZrOCl_2$. În acest scop am preparat din rezină o soluţie în alcool metilic absolut, în diluţie corespunzătoare, căreia i-am înregistrat spectrul de absorbţie în UV, atît înainte cît şi după adăugarea a 1 ml soluţie $ZrOCl_2$ 2,5% în alcool metilic absolut. În acest mod am construit o curbă de etalonare la 322 nm, utilizînd 0,125, 0,250, 0,500, 0,750 şi 1,00 mg rezină cu 1 ml $ZrOCl_2$ 2,5% şi adusă la 25 ml cu metanol absolut. Citirea extincţiilor s-a efectuat la un aparat VSU-2P (C. Zeiss).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Analizînd cromatograma din figura 1 constatăm că în catafile şi inima mugurelui flavonele sînt mai slab reprezentate, în ultima fiind prezentă o singură fracţiune flavonică. Putem astfel considera că în mugurii

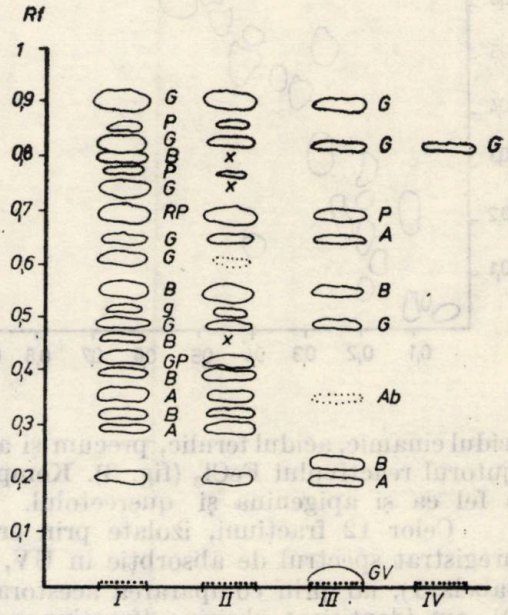


Fig. 1. — Cromatografia pe strat subţire a extractului de muguri de plop (I), extractului de propolis (II), de catafile (III) şi din partea centrală a mugurelui de plop (IV). Identificare în lumină UV cu $ZrOCl_2$. G—galben; g—galben deschis; *Ab.* —albastru; *B*—brun; *R*—roşu; *P*—portocaliu.

de plop falvonoidele sînt localizate, aproape exclusiv, în rezină. În catafile şi „inimă" am pus în evidenţă alţi compuşi chimici, între care glicozide fenolice şi, probabil unele fracţiuni glicozidate ale flavonelor.

Reacţiile de culoare cu reactivii specifici au fost pozitive pentru rezină, foarte slabe pentru catafile şi negative pentru „inimă".

Avînd în vedere polaritatea sistemului de solvenţi folosit se poate aprecia că flavonoidele se găsesc în rezină numai sub formă de agliconi.

Din analizele celor două cromatograme se relevă un număr mare de compuși flavonoidici. Dintre cele 19 fracțiuni puse în evidență prin cromatografie unidimensională, 16 sînt comune cu cele din propolis. Semnalăm însă și unele diferențe cantitative între fracțiuni. Prin cromatografie bidimensională am pus în evidență un număr de 26 fracțiuni, a căror valoare Rf se poate vedea din figura 2.

Pe lîngă flavone, cu ajutorul substanțelor de referință am mai identificat derivații fenil-propanici, cu fluorescență albastră: acidul cafeic,

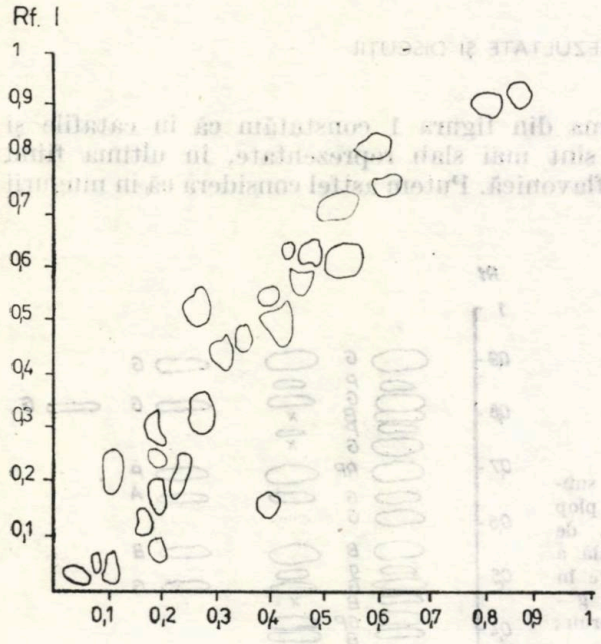


Fig. 2. — Cromatografia bidimensională pe strat subțire de silicagel a extractului din rezina de muguri de plop.

acidul cinamic, acidul ferulic, precum și acidul benzoic, pus în evidență cu ajutorul reactivului $FeCl_3$ (fig. 3). Kempferolul se găsește numai în urme, la fel ca și apigenina și quercetolul.

Celor 12 fracțiuni, izolate prin cromatografie preparativă, li s-au înregistrat spectrul de absorbție în UV, în prezență de $AlCl_3$ și MeONa (tabela 1), iar prin compararea acestora cu cele prezentate în literatură (9), am identificat chrisina (fracțiunea VI) și pinocembrina (fracțiunea IV). Pentru celelalte fracțiuni separate nefiind date în literatură, le caracterizăm numai prin valoare Rf și fluorescență.

Considerînd că rezina are un conținut de cca 2/3 flavone (1), cu ajutorul curbei de etalonare (fig. 4), se poate calcula conținutul în flavone din soluțiile extractive ale mugurilor de plop și din propolis, legea Lambert-Beer fiind respectată între 0,125—1,00 mg rezină. Prin această metodă am determinat conținutul de flavone dintr-o soluție extractivă de muguri de plop și dintr-o probă de propolis. Am determinat 8,05% flavone și în mugurii de plop și 6,42% în proba de propolis cercetată.

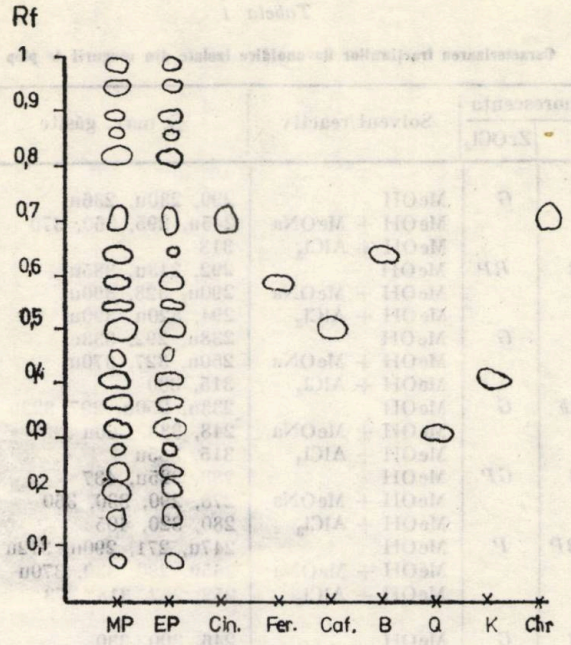


Fig. 3. — Cromatografia pe strat subțire a extractului de muguri de plop (*MP*), extract de propolis (*EP*), acid cinamic (*Cin*), acid ferulic (*Fer*), acid cafeic (*Caf*), acid benzoic (*B*), quercetol (*Q*), kempferol (*K*) și chrisină (*Chr*).

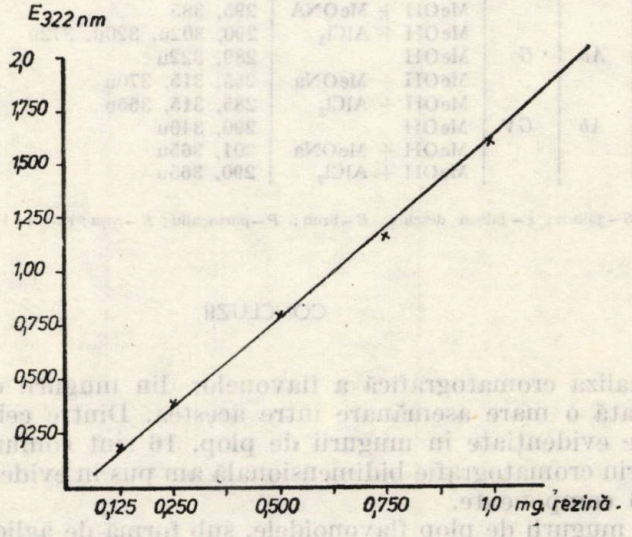


Fig. 4. — Explicația în text.

Tabela 1

Caracterizarea fracțiunilor flavonoidice izolate din mugurii de plop

Nr. fracț.	Val. Rf	Fluorescența —	Fluorescența $ZrOCl_2$	Solvent/reactiv	λ max. găsite	λ max. lit.
I	0,92	*g*	*G*	MeOH	290, 230u, 236u	
				MeOH + MeONa	245u, 295, 360, 370	
				MeOH + $AlCl_3$	313	
II	0,80	*B*	*RP*	MeOH	292, 343u, 385u	
				MeOH + MeONa	290u, 328, 390u	
				MeOH + $AlCl_3$	294, 320u, 390u	
III	0,77	*r*	*G*	MeOH	238u, 292, 333u	
				MeOH + MeONa	250u, 327, 370u	
				MeOH + $AlCl_3$	315, 380	
IV	0,73	*Ab*	*G*	MeOH	233u, 250u, 297, 322u	289, 325u
				MeOH + MeONa	248, 333, 360u	245, 324
				MeOH + $AlCl_3$	315, 385u	311,375
V	0,70	*B*	*GP*	MeOH	283, 325u, 437	
				MeOH + MeONa	278, 290, 330, 360	
				MeOH + $AlCl_3$	280, 320, 405	
VI	0,66	*BP*	*P*	MeOH	247u, 271, 290u, 312u	247u, 268, 313
				MeOH + MeONa	265u, 280, 330, 370u	263u, 288,361
				MeOH + $AlCl_3$	252, 282, 318, 373	252, 279, 330, 380
VII	0,62	*B*	*G*	MeOH	246, 300, 330	
				MeOH + MeONa	254, 280u, 312, 383	
				MeOH + $AlCl_3$	228u, 254, 311u, 362	
VIII	0,58	*Ab*	*Ab*	MeOH	289, 310	
				MeOH + MeONa	393u, 310, 330, 415u	
				MeOH + $AlCl_3$	231u, 300u, 323, 390u	
IX	0,54	*Ab-g*	*G*	MeOH	290, 312, 360u	
				MeOH + MeONa	290, 308, 410	
				MeOH + $AlCl_3$	235u, 304, 330	
X	0,50	*B*	*B*	MeOH	292, 343	
				MeOH + MeONA	295, 385	
				MeOH + $AlCl_3$	290, 302u, 320u, 372u	
XI	0,46	*Ab*	*G*	MeOH	289, 322u	
				MeOH + MeONa	255, 315, 370u	
				MeOH + $AlCl_3$	285, 315, 365u	
XII	0,40	*Ab*	*GV*	MeOH	290, 340u	
				MeOH + MeONa	301, 365u	
				MeOH + $AlCl_3$	290, 365u	

Ab — albastru; *G* — galben; *g* — galben deschis; *B* — brun; *P* — portocaliu; *R* — roșu; *r* — roz; *V* — verde; *u* umăr.

CONCLUZII

1. Analiza cromatografică a flavonelor din mugurii de plop și din propolis arată o mare asemănare între acestea. Dintre cele 19 fracțiuni flavonoidice evidențiate în mugurii de plop, 16 sînt comune cu cele din propolis. Prin cromatografie bidimensională am pus în evidență în mugurii de plop 26 componente.

2. În mugurii de plop flavonoidele, sub formă de agliconi, sînt localizate, aproape exclusiv, în secrețiile rezinoase de sub primele catafile.

3. Cu ajutorul substanțelor de referință am identificat 8 componente, iar pe baza spectrelor de absorbție în UV am identificat chrisina și pinocembrina.

4. Prin cromatografie preparativă pe strat subțire de silicagel au fost izolate 12 fracțiuni flavonoidice din rezina de muguri de plop, care au fost caracterizate prin spectrul de absorbție în UV, valoarea RF și fluorescență.

5. Am elaborat o metodă de dozare spectrofotometrică în UV a flavonoidelor totale din mugurii de plop, propolis și soluțiile extractive ale acestora.

Prezentat la redacție
la 26 ianuarie 1979

Facultatea de farmacie Cluj-Napoca
și I.C.C.F. Cluj-Napoca

THE FLAVONOIDES OF POPLAR BUDS

SUMMARY

The flavonoids of poplar buds were studied comparatively with the flavonoids of one propolis sample, by thin layer chromatography and UV spectroscopy. 19 spots of flavonoids were visualized and from these 16 are identical with those from the propolis sample. 12 fractions were isolated and characterized by their UV spectrum, the Rf values and their natural fluorescence and after spraying with $ZrOCl_2$.

Chrisin, pinocembrin, caffeic acid, ferulic acid, cinnamic acid and benzoic acid were identified.

In poplar buds the flavonoids are localised, mainly within the resinous secretions of the first cataphylls.

The quantitative determination of the total flavonoids was achieved by the UV spectrophotometric method, with $ZrOCl_2$ as reagent. The poplar buds contain 8.05% and the propolis 6.42% flavonoids.

BIBLIOGRAFIE

1. * * * *Propolisul.* Edit. Apimondia, București, 1975.
2. E. Derevici, *Contribuții la studiul propolisului* în *Cercetări noi în apiterapie*, Edit. Apimondia, București, 1976, p. 196.
3. R. Hegnauer, *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Bd. VI, Birkhäuser Verl. Basel und Stuttgart, 1973, p. 250.
4. J. Metzner, H. Bekemeier, E. Schneidewind, R. Schweiberger, Pharmazie, *30*, 799 (1975).
5. E.-M. Schneidewind, H. Kala, B. Linzer, J. Metzner: Pharmazie, *30*, 803 (1975).
6. E. G. Negulescu, Al. Săvulescu, *Dendrologie*, Edit. Agrosilvică, București, 1965, p. 240.
7. T. A. Geissman, *The chemistry of flavonoids compounds*, Pergamon Press, Oxford—London—New York—Paris, 1962, p. 51.
8. J. B. Harborne, *Biochemistry of phenolic compounds*, Acad. Press London—New York, 1964, p. 46, 57.
9. T. J. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas, *The systematic identification of flavonoids*, Springer Verl., Berlin—Heidelberg—New York 1970.
10. E. Stahl, *Thin layer chromatography*, Springer Verl. Berlin—Heidelberg—New York, 1965, p. 376.

PURIFICAREA ALBUMINEI SERICE ÎN SCOPUL UTILIZĂRII EI CA REACTIV ÎN TEHNICA LIPIDOGRAMEI

C. VLĂDESCU, CEZARINA CUCU, MARGARETA ŞERBAN

Rezumat. S-a purificat albumina prin metoda de precipitare fracţionată a proteinelor serice cu sulfat de amoniu, urmată de cristalizarea ei la punctul izoelectric. După dializă şi concentrare, albumina obţinută a fost comparată atît din punctul de vedere al gradului de puritate electroforetică cît şi al conţinutului lipidic cu albumina furnizată de firma SERVA. Concordanţa rezultatelor obţinute conduc la concluzia că, folosind modalităţi tehnice simple şi materie primă foarte accesibilă în laboratoarele clinice, există posibilitatea de a obţine albumină purificată, necesară ca reactiv în tehnica separării lipoproteinelor serice.

Lucrarea expune date preliminare asupra încercărilor de obţinere a albuminei pure, necesară ca reactiv în tehnica separării electroforetice a lipoproteinelor plasmatice. S-a pornit de la necesitatea înlocuirii acestui reactiv, procurat la ora actuală numai din import — la un preţ ridicat — şi de la ideea utilizării resturilor de ser sanguin existente zilnic în laboratorul de biochimie. Obţinerea în cantitate suficientă de albumină purificată face posibilă aplicarea pe scară largă a metodei de separare electroforetică a lipoproteinelor plasmatice, necesară în diagnosticul diferenţial al dislipidemiilor.

MATERIAL ŞI METODE

În literatură există descrise diferite tehnici de separare a albuminei (1, 2, 3, 4); dat fiind scopul final al lucrării, din toate aceste metode am ales tehnica de precipitare cu sulfat de amoniu semisaturat, la punctul izoelectric al albuminei (5).

Serul sanguin utilizat a provenit din resturile de ser rămas după efectuarea analizelor biochimice; amestecul de seruri a fost conservat cu azidă de sodiu, la rece. În general, a fost utilizat serul strîns din 1—2 zile, în raport cu cantitatea necesară procedeului de purificare.

Metoda de separare folosită de noi este metoda clasică de precipitare prin relargaj a proteinelor serice cu sulfat de amoniu. În această metodă, după îndepărtarea globulinelor prin semisaturarea serului cu sulfat de amoniu, supernatantul este adus prin acidulare la pH=4,7 (6), pH-ul izoelectric al albuminei. Controlul dinamic al pH-ului s-a făcut potenţiometric, cu ajutorul unui pH-metru MV 11-RDG.

Purificarea albuminei astfel obţinute s-a realizat prin dizolvări repetate în soluţii semisaturate de sulfat de amoniu la pH = 5,6, urmate de reprecipitări prin aducerea pH-ului la punctul izoelectric. După purificare, soluţia de albumină s-a dializat contra apei distilate, apoi contra ser fiziologic, după care a fost concentrată cu ajutorul aparatului de ultrafiltrare cu presiune pozitivă de azot (AMICON). Preparatul proteic astfel obţinut a fost verificat din punctul de vedere al gradului de puritate electroforetică, al conţinutului în proteină şi al conţinutului lipidic.

Metodele analitice utilizate în acest scop au fost:

— determinarea concentraţiei proteice prin metoda Biuretului (7);
— determinarea conţinutului lipidic prin metoda colorimetrică cu fosforanilină (8);
— microelectroforeza pe gel de agar, în tampon medinal-veronal, pH = 8,6.

După aceste verificări prealabile, albumina purificată a fost folosită ca reactiv în separarea electroforetică a lipoproteinelor plasmatice, după metoda Noble (9), folosind ca suport de migrare un amestec de gel agar-agaroză. S-a comparat albumina obţinută de noi cu albumina cristalizată furnizată de firma SERVA (R.F.G.)

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Aplicînd asupra serului total metoda de separare prin relargaj, se observă că odată cu precipitarea globulinelor, acestea antrenează şi o cantitate de albumină. De asemenea, aşa cum se constată din figura 1, în prima fază de separare a albuminei, controlul electroforetic arată că şi această proteină este impurificată cu resturi de globuline.

Determinarea conţinutului lipidic arată existenţa unor resturi lipidice. S-a încercat o delipidare prealabilă a serului prin extracţie cu cloroform, urmată de separarea albuminei după tehnica descrisă mai sus. Nu se constată nici o îmbunătăţire a gradului de puritate (fig. 1, *d*).

Albumina obţinută în această primă fază de precipitare este dizolvată la pH = 6 şi reprecipitată la punctul său izoelectric. Controlul electroforetic arată că proteina obţinută este albumină pură (fig. 2).

Nici în această a doua fază de purificare, produsul delipidat în prealabil nu a arătat un grad mai înalt de puritate. Acest control electroforetic s-a efectuat (aşa cum reiese din fig. 2) comparativ şi pe albumină SERVA.

S-au efectuat de asemenea şi determinări cantitative ale conţinutului proteic şi lipidic în produsele obţinute în cele două etape de purificare, atît în varianta care porneşte direct de la ser, cît şi în cea în care s-a practicat delipidarea prealabilă (tabelul 1).

Tabela 1

Determinarea conţinutului proteic şi lipidic şi preparatele de albumină obţinute prin precipitare cu sulfat de amoniu

Preparate	Faza de purif.	ALBUMINĂ gr/l	LIPIDE gr/l	ALBUMINĂ/LIPIDE
SER		44	9	5
PREPARAT DE ALBUMINĂ	I	17	0,1	170
	II	63	0,29	217
PREPARAT DE ALBUMINĂ DELIPIDIZAT	I	9	0,1	90
	II	55	0,26	212

Din compararea acestor rezultate reiese faptul că extracţia cu cloroform, fără a avea o eficacitate crescută în ce priveşte creşterea gradului de puritate, complică metodologia de purificare. Dealtfel, impurităţile de componenţă lipidică rămase în preparatul de albumină sînt într-o cantitate care nu afectează cu nimic calitatea lipidogramelor. Din tabela 1

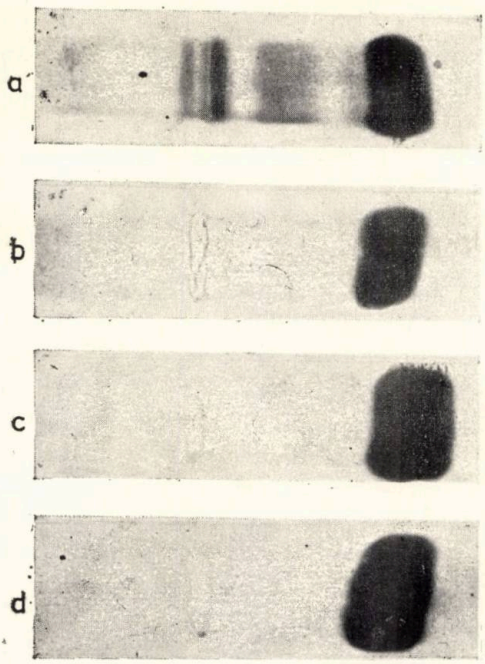


Fig. 1. — Controlul electroforetic al purității albuminei izolate după prima etapă de purificare.
a) electroforeza de referință (a serului de la care s-a pornit purificarea ; *b*) precipitatul de globuline redizolvat ;
c) albumină obținută fără delipidizare ; *d*) albumină obținută cu delipidizare (în $CHCl_3$).

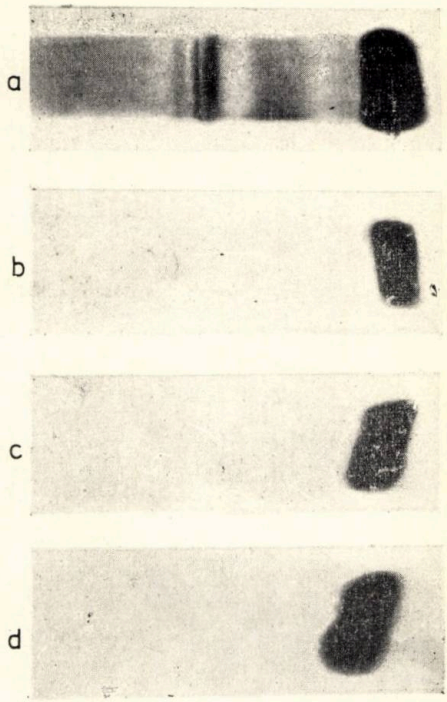


Fig. 2. — Controlul electroforetic al purității albuminei izolat, după a doua etapă de prelucrare.
a) electroforeza de referință (a serului de la care s-a pornit purificarea) ; *b*) albumină obținută fără delipidizare ; *c*) albumină obținută cu delipidizare (cu $CHCl_3$) ; *d*) albumină standard „SERVA".

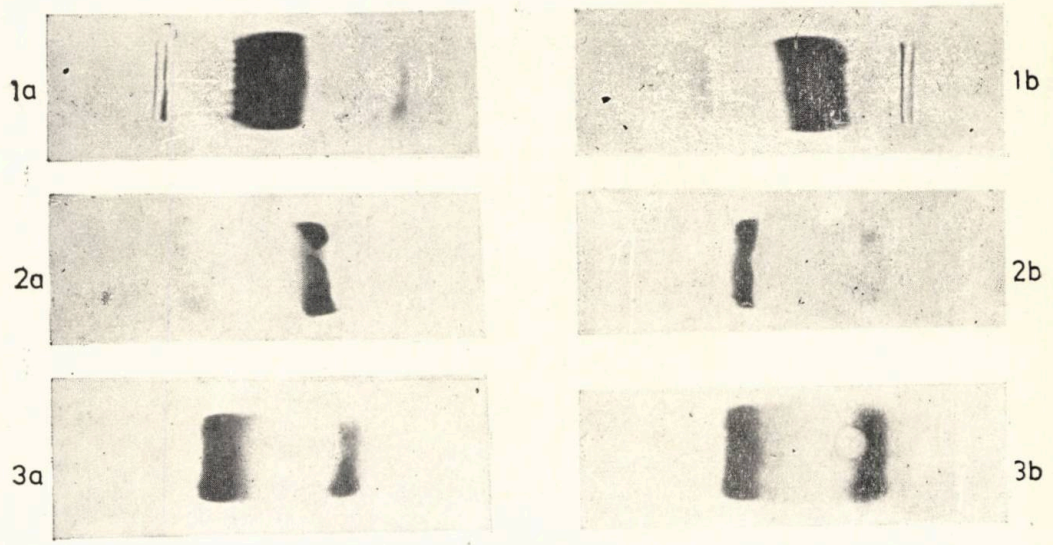


Fig. 3. — Tipuri diferite de lipidograme.
1*a*, 2*a*, 3*a*) modele electroforetice realizate pe suport agar-agaroză conținînd albumină purificată ;
1*b*, 2*b*, 3*b*) modèle electroforetice realizate pe suport agar-agaroză conținînd albumină „SERVA".

se observă că în preparatul final de albumină mai există o cantitate de lipide de 29 mg% ml. În amestecul de agar-agarozã cu albumină inclusă, necesar desfășurării unei lipidograme, cantitatea de impuritate lipidică ajunge la valoarea de 0,02 mg, complet nesemnificativă în raport cu concentrația lipidelor plasmatice.

Compararea din punct de vedere calitativ a lipidogramelor obținute cu albumina purificată de noi cu cele la care s-a folosit albumina SERVA arată că reactivul de import poate fi substituit cu produsul indigen. În figura 3 sînt redate — comparativ — cîteva modele de lipidograme.

CONCLUZII

1. Pentru obținerea unui preparat pur de albumină, necesară în tehnica de separare electroforetică a lipoproteinelor serice, sînt suficiente doar două etape de purificare; un număr mai mare de recristalizări nu crește gradul de puritate, dar scade în schimb randamentul cantitativ.

2. Delipidarea prealabilă a serului s-a dovedit a fi ineficace în procedura de purificare a albuminei.

3. Folosind modalități tehnice simple și materie primă foarte accesibilă în laboratoarele clinice, există posibilitatea de a obține albumină purificată, necesară în separarea electroforetică a lipoproteinelor serice.

Prezentată la redacție
la 20 octombrie 1978

Institutul de medicină internă „N. Gh. Lupu"
și
Clinica medicală Colentina I.M.F. București

LA PURIFICATION DE L'ALBUMINE SÉRIQUE EN VUE DE SON UTILISATION COMME RÉACTIF POUR LA TECHNIQUE DES LIPIDOGRAMMES

RÉSUMÉ

On a isolé l'albumine par des précipitations et dissolutions successives des protéines sériques dans des solutions demi-saturées de sulfate d'ammonium pH = 5,6 suivies de précipitation de l'albumine à son point isoélectrique. Après la dyalise et la concentration nécessaires, le degré de pureté et le contenu en lipides de l'albumine obtenue ont été comparés à celles de l'albumine produite par les laboratoires SERVA. La concordance des résultats obtenus démontre que, en utilisant des modalités techniques simples et du matériel biologique facilement fourni par les laboratoires cliniques, le réactif importé peut être remplacé par cette albumine purifiée, en vue de son utilisation dans la technique de séparation électrophorétique des lipoprotéines plasmatiques.

BIBLIOGRAFIE

1. P. Georgescu, E. Păunescu, *Metode biochimice de diagnostic și cercetare*, Ed. Medicală, 1960, 337.
2. L. Wurmann, G. Wunderly, *The Human Blood Proteins*, Ed. Grune-Stratton, New York, London, 1960, 87.
3. H. Peters, *Proteids of the Biological Fluid*, Elsevier publ. comp., Amsterdam—London—New York, 1967, 607.
4. E. Curling, Vox Sang., *33*, 97 (1977).
5. V. Gheție, V. Micușan, *Analiza imunochimică — teorie și practică*, Ed. Acad. R.S.R., 1966, 87.
6. E. Soru, *Biochimie medicală*, Ed. Medicală, 1959, 250.
7. A. Gornall, C. Badawil, M. David, J. Biol. Chem., *177*, 751 (1949).
8. N. Zöllner, K. Kirsch, Ztschr. Ges. Exp. Med., *135*, 545 (1962).
9. R. P. Noble, J. of Lipid Research, *9*, 693 (1968).

REFERAT GENERAL

SUGESTII PENTRU O SPECTROSCOPIE BIOLOGICĂ

S. COMOROŞAN, ELENA ALEXANDRESCU, S. CINCA, DOMNIŢA CRIŞAN, M. HRISTEA, LILIANA PÎSLARU, VESELCA POPESCU, V. TIRON, SILVIA VIERU

S-a constatat experimental că iradierea substratelor enzimatice cu lumină vizibilă de 546 nm induce creşteri ale vitezei reacţiilor enzimatice. Acest efect apare ca o funcţie periodică de durata de iradiere a substratului. Se înregistrează o durată de iradiere minimă, denumită parametrul t_m, care induce prima creştere a vitezei reacţiei enzimatice şi un interval fix de timp, denumit parametrul τ, care delimitează două efecte succesive. Toate valorile numerice ale parametrilor t_m şi τ apar ca multipli de 5 s. S-a constatat că atunci cînd apa folosită pentru a dizolva substanţa iradiată este anterior tratată cu ultrasunete ($\nu = 0{,}8$ MHz), efectul indus de substratul iradiat în reacţia enzimatică respectivă este abolit. S-a avansat ideea că apa, ca entitate macroscopică, posedă o caracteristică încă necunoscută care a fost denumită ,,prestructură''. S-a observat că atunci cînd fasciculul de lumină cu $\lambda = 546$ nm folosit pentru iradierea substratului este intersectat de alt fascicul de lumină, efectul indus în substratul iradiat este şters. Acest fenomen surprinzător, independent de frecvenţa fasciculelor care se intersectează, sugerează un tip cu totul nou de interacţiune foton-foton. Această interacţiune apare net cuantizată în timp, în ,,pachete'' de 5 s. S-a sugerat o nouă proprietate a materiei, ,,*biospinul*'', corelată în substanţa iradiată şi în fasciculul luminos, pentru a explica datele experimentale. Datorită netei cuantizări temporale prezente în toată această fenomenologie s-a avansat ideea unei ,,particule de timp'', care a fost denumită ,,*cronon*''.

INTRODUCERE

Sistemele biologice se caracterizează printr-un înalt grad de complexitate. Pentru studiul lor, biologia a elaborat o metodologie care îi este proprie. Sistemul de investigat este *descris* (de obicei în limbaj morfologic) şi *descompus* în părţi mai elementare, care sînt analizate cu tehnici împrumutate din chimie şi fizică. Biologia nu a reuşit — şi nici nu s-a preocupat — să analizeze profunda alterare a dinamicii iniţiale a sistemului, în urma descompunerii lui în elemente mai simple. Acest lucru a făcut ca rezultatele să fie greu de analizat prin prisma ştiinţelor zise ,,exacte'' şi adeseori biologia să fie considerată ,,un morman de date fără teorie''.

Sistemele biologice (de tip macromolecular) prezintă proprietăţi cu totul aparte, neîntîlnite în sistemele fizice, dar incluzînd proprietăţile acestora. Una din aceste proprietăţi o reprezintă *specificitatea biologică*. În contextul de faţă definim specificitatea ca proprietatea macromoleculelor biologice de a reacţiona — în condiţii (iniţiale) determinate — numai cu un partener sau cu o clasă de substanţe bine stabilite. Această ,,putere de recunoaştere'' a unor sisteme biologice, (enzime, membrane celulare, receptori celulari etc.), prezintă un interes deosebit. Într-adevăr, se poate pune următoarea problemă: pot fi utilizate sistemele biologice macro-

moleculare ca „aparate"de măsură? Cu alte cuvinte, pot fi utilizate — de exemplu enzimele — pentru a detecta cu ele anumite modificări fizice, induse în partenerii lor, numiți substrate? Dacă asemenea tipuri de experiențe sînt semnificative, atunci se poate concepe o *biofizică inversă*. În biofizica convențională transferul de tehnică se face de la fizică la biologie. Sistemele biologice sînt investigate cu instrumente fizice. În biofizica inversă, sugerată de noi, transferul de tehnică se face de la biologie la fizică. Sistemele fizice sînt investigate cu instrumente biologice. Ținînd seama de proprietățile deosebite ale „aparatelor" biologiei (i.e. sisteme complexe dotate cu o mare putere de recunoaștere), este de așteptat ca și rezultatele obținute cu noul tip de aparatură să fie deosebite.

Fie un sistem fizic care este investigat cu o tehnică biologică. În acest context un model experimental interesant îl constituie interacțiunea dintre cîmpul electromagnetic și diferite substanțe. În urma acestei interacțiuni substanțele prezintă diferite tipuri de tranziții detectabile cu instrumente fizice. Aceste experiențe formează domeniul vast al spectroscopiei fizice. Într-o accepțiune mai generală a acestei scheme, așa cum face Weisskopf [1] se poate considera abordarea sistemelor fizice la diferite domenii ale energiei, cu inducerea unor stări excitate, care sînt apoi detectate și catalogate. Astfel, spectroscopia moleculară este legată de stările excitate în molecule (translaționale, rotaționale, vibraționale). Weisskopf definește apoi spectroscopia atomică, legată de nivelele cuantice ale atomului, spectroscopia nucleară, legată de nivelele cuantice ale nucleului și spectroscopia nucleonică legată de nivelele cuantice ale nucleonului. În același context noi sugerăm o altă spectroscopie pe care o numim *spectroscopia biologică* [2]. În acest nou tip de spectroscopie, tranzițiile fizice induse în diferite substanțe cu ajutorul unor cîmpuri electromagnetice (sau prin bombardamente cu particule de diferite energii) sînt „detectate" de sistemele biologice.

UN MODEL EXPERIMENTAL PENTRU DETECTAREA TRANZIȚIILOR FIZICE CU SISTEME BIOLOGICE

Fie o macromoleculă de origine biologică (MB) dotată cu proprietatea de specificitate și un partener de reacție P — adică o substanță reacționînd specific cu respectiva macromoleculă. Să considerăm reacția :

$$(MB) + P \rightarrow P' \qquad (1)$$

adică transformarea (specifică) a substanței P în substanța P'. Vom numi acest tip de reacții *fenomenologie biologică*. O clasă tipică de reacții de acest fel o reprezintă, spre exemplu, interacțiunea dintre enzime și substratele lor. În laborator, aceste reacții se urmăresc prin determinarea vitezei de apariție (sau dispariție) a substanței P' (sau P).

Să inducem în partenerul de reacție P considerat mai sus o modificare fizică. Fie această modificare

$$P \rightarrow P^* \qquad (2)$$

Prin abuz de terminologie vom numi această modificare *tranziție fizică* și vom zice că substanța respectivă a trecut din „starea" P în „starea" P^*. Evident, în acest context, utilizăm conceptul fizic de „stare" în semnificația sa strict intuitivă. Vom numi acest tip de experimente *fenomenologie fizică*. În laborator, un mod convenabil de a induce modificări fizice în substanțe îl constituie iradierile cu radiații electromagnetice și în particular, cu fascicule de lumină.

Să considerăm din nou, reacția (1) dar de data aceasta, macromolecula (MB) interacționînd cu partenerul de reacție P^*, modificat din punct de vedere fizic prin iradiere. În acest caz, reacția (1) se va scrie :

$$(MB) + P^* \rightarrow P^{*\prime} \tag{3}$$

adică transformarea (specifică) a substanței iradiate P^* în substanța $P^{*\prime}$. Evident, de data aceasta vom urmări în laborator viteza de apariție/ /(dispariție) a substanței $P^{*\prime}/(P^*)$. Vom numi acest tip de reacții *fenomenologie biofizică*.

Emitem următoarea ipoteză : pentru anumite condiții de iradiere, viteza de reacție a unei substanțe *iradiate* P^*, cu o macromoleculă biologică specifică (MB), va fi diferită de viteza de reacție a aceleiași substanțe P, neiradiate, cu aceeași macromoleculă biologică (MB), adica

$$V(P^*) \neq V(P) \tag{4}$$

Macromoleculele biologice utilizate în contextul de mai sus vor fi numite „senzori" sau „aparate de măsură".

În cadrul ipotezei de mai sus, inducerea în substanțele iradiate a unor modificări fizice detectabile prin investigația curentă (de exemplu formarea de radicali liberi) reprezintă cazul trivial. În contextul de față, ne interesează acele (posibile) modificări fizice induse în substanțe prin diferite tipuri de iradieri — care să nu fie detectabile prin investigația fizică curentă, dar care eventual să fie detectate prin modificarea vitezei de reacție.

DISPOZITIVUL EXPERIMENTAL DE IRADIERE

Este format din : sursa de lumină, sistemul de fante, dispozitivu de monocromare și dispozitivul de măsurat timpul.

Sursa de lumină. Este reprezentată de becurile de tungsten sau lămpile cu vapori de mercur. Am lucrat cu o gamă largă de becuri de tungsten (General Electric 150 W, Sylvania 150 W, alimentat în curent continuu sau alternativ, Tesla 150 W, Narva, cu halogen, 500 și 650 W), toate dovedindu-se utilizabile în dispozitivul de iradiere. Am lucrat de asemenea cu lămpi cu vapori de mercur, de presiune înaltă, medie sau joasă, din seria Philips, cu răcire cu apă și cu lampa indigenă UV—IR—1, 70 W, 220 V. Lămpile cu vapori de mercur, emițînd puternic linia $\lambda = 546$ nm (implicată în inducerea efectelor descrise în această lucrare) dau rezultate deosebit de omogene și reproductibile.

Sursa de lumină trebuie să îndeplinească o serie de condiții, pentru a induce în substanțele iradiate modificări fizice detectabile cu reacții biologice. Prima cerință o reprezintă realizarea unui prag de iluminare corespunzător, la nivelul țintei. În cele ce urmează, exprimăm out-put-ul sursei de iradiere în unitatea de iluminare (engleză) footcandle, fc (lumen/ /square foot), unitate curent întîlnită la instrumentele de măsură a iluminării. Pentru evitarea confuziilor, întîlnite adesea în radiometrie din cauza terminologiei largi, explicităm mai jos termenii utilizați de noi [3]. Puterea sursei este descrisă prin termenul *intensitate*. Procesul energetic radiant la nivelul țintei este descris prin termenii *iluminare*, iar cantitatea măsurată se numește *iluminanță*. Pentru experimentele descrise în lucrare, sursa de lumină trebuie aleasă astfel ca la nivelul țintei să se realizeze o iluminare de aproximativ 200—500 fc. Acest „prag", sub care nu se mai produc modificări detectabile prin reacții biologice, *nu* depinde de natura chimică a substanței iradiate, ci de natura biologică a senzorului. Pentru o vastă categorie de enzime investigate (vezi o trecere în revistă [4]), acest prag a fost determinat prin tatonări experimentale pentru fiecare caz în parte.

O a doua cerință a sursei de lumină o reprezintă stabilitatea caracteristicilor de ieșire. Această condiție este mai strictă în cazul lămpilor de tungsten, care prin supraîncălzire prezintă o intensitate fluctuantă. Este necesară montarea unor sisteme de răcire cu apă în jurul becurilor, care să asigure o stabilitate a iluminării de probă, de aproximativ $\pm$ 10 fc.

O a treia cerință o reprezintă izolarea sursei de lumină într-un dispozitiv care să evite orice fel de altă iluminare a probei, în afara fasciculului de iradiere, *strict vertical* pe țintă.

Sistemul de fante. Pentru fiecare dispozitiv de iradiere trebuie utilizat un sistem de fante, astfel ca la nivelul probei iradiate să apară un spot luminos, omogen, fără umbre și franje. Sînt absolut necesare două fante : prima se plasează imediat sub sursa de lumină, pentru a bloca razele laterale, în special la lămpile cu oglinzi focalizatoare ce dau reflexii multiple. A doua se plasează imediat deasupra probei de iradiat, pentru a reduce conul de lumină la un fascicul cît mai colimat posibil. Dimensiunea fantelor se ajustează pentru a realiza cerințele de mai sus.

Dispozitivul de monocromare. În experiențele noastre am utilizat lumină monocromată cu $\lambda = 546$ nm. Orice filtre pot fi întrebuințate în acest scop. Noi am lucrat cu filtre interferențiale cu semilărgime între 5—15 nm (importantă în special la becurile de tungsten ce emit un spectru continuu) și transmitanță între 30—50%. Din motive practice este recomandată plasarea filtrului cît mai departe de sursa de lumină (care degajă căldură) și cît mai aproape de probă.

Dispozitivul de măsurat timpul este reprezentat de un modul electronic (divizor de timp) care comandă închiderea/deschiderea unei diafragme. Modulul utilizat de noi (UniBlitz, Vincent Ass.) realizează o precizie de pînă la 10^{-3} s în timpul de expunere. Pentru a obține rezultate reproductibile, în cadrul unui timp de iradiere fixat, este necesară o precizie de aproximativ $\pm$ 0,1—0,2 s în timpul de expunere a probei. Plasarea diafragmei în cadrul dispozitivului de iradiere este arbitrară. Ea trebuie așezată astfel încît să fie *perfect centrată* cu filtrul și fantele

și să concure la realizarea pe probă a unui fascicul colimat, rezultînd un spot omogen, cu valoarea iluminanței dictată de pragul senzorului biologic utilizat. Schema unui dispozitiv de iradiere este prezentată în figura 1.

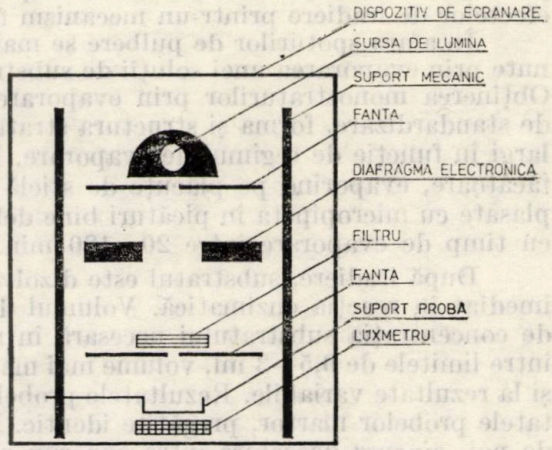


Fig. 1. — Schema dispozitivului de iradiere.

INVESTIGAȚIA RELAȚIEI ÎNTRE SUBSTANȚELE IRADIATE ȘI ENZIME

Enzimele reprezintă o clasă de senzori biologici deosebit de potriviți pentru detectarea modificărilor induse în substratele lor, prin iradierea cu $\lambda = 546$ nm.

Pregătirea substratelor enzimatice pentru iradiere. Efectele iradierii cu lumină din domeniul vizibil prezentate de noi în noua fenomenologie reprezintă efecte de corp solid [5]. Ele apar la iradierea substanțelor de tip cristalin, în stare solidă și nu apar la iradierea soluțiilor respective. Pentru iradiere, substratul ce urmează a fi iradiat se pregătește într-un mod special. Într-o fiolă de sticlă cu fund plat, se cîntărește riguros o cantitate de substrat (aleasă în funcție de concentrația finală necesară în mediul de reacție al enzimei) care se împrăștie fin, sub forma unui spot de pulbere, fără straturi suprapuse (monostrat). Diametrul monostratului de substrat trebuie aranjat astfel încît să fie mai mic decît diametrul spotului de lumină, spre a fi omogen iradiat, pe *toată* suprafața sa. În producerea efectului de iradiere, pare a fi implicat un fenomen de cooperativitate, observat de noi în mod indirect. Astfel, spoturile de pulbere în care microcristalele au contact unele cu altele (fără a realiza totuși straturi suprapuse) dau rezultate superioare celor obținute cu spoturi împrăștiate mai larg, cu spații libere între microconglomeratele cristaline. Densitatea de substanță pe aria de expunere la iradiere se ajustează arbitrar, în funcție de natura substanței utilizate. Pentru majoritatea substratelor investigate de noi, densitățile au fost între 3—6 mg/cm^2 iar diametrele spoturilor de substrat între 0,5—1,0 cm, față de un spot luminos cu diametrul maxim de 2 cm. Efectele de iradiere nu apar decît dacă monostratul de pulbere este *perfect uscat*. Ca regulă generală, pulberile de substrat

pregătite pentru iradiere sînt lăsate peste noapte într-un exicator cu $CaCl_2$. Ele se pun sub lampa de iradiere, direct din exicator, reducînd la minimum timpul de contact cu aerul. Rezultate omogene și reproductibile au fost obținute plasînd dispozitivul de iradiere sub un clopot de sticlă, în care s-a realizat un vid de 0,5 torri (acest sistem de iradiere exclude și posibilitatea interpretării triviale a implicării oxigenului în inducerea efectelor de iradiere printr-un mecanism fotochimic de tip convențional).

În afara spoturilor de pulbere se mai pot utiliza monostraturi obținute prin evaporarea unei soluții de substrat, de o concentrație adecvată. Obținerea monostraturilor prin evaporare prezintă însă mari dificultăți de standardizare, forma și structura straturilor obținute variind în limite largi în funcție de regimul de evaporare. Noi am obținut rezultate satisfăcătoare, evaporînd pe plăcuțe de sticlă 2/2 cm volume de 20—50 μl plasate cu micropipeta în picături bine delimitate, la un vid de 0,5 torri cu timp de evaporare între 20—120 min.

După iradiere, substratul este dizolvat în apă tridistilată și utilizat imediat în reacția enzimatică. Volumul de dizolvare se alege în funcție de concentrația substratului necesară în reacție. El trebuie însă ajustat între limitele de 0,5—3 ml, volume mai mari ducînd la reducerea efectului și la rezultate variabile. Rezultatele probelor iradiate se compară cu rezultatele probelor martor, pregătite identic. În noua fenomenologie descrisă de noi, *singura* deosebire între experiment și controlul său o reprezintă faptul că în proba experiment, substanța chimică respectivă a fost în prealabil iradiată.

A. CINETICA REACȚIEI ENZIMATICE

Detectarea efectelor de iradiere induse în substrate, prin urmărirea reacției enzimatice, este posibilă numai în anumite domenii ale cineticii respective. Din cinetica enzimatică tradițională se știe că există o dependență liniară între viteza reacției și concentrația de enzimă (respectiv concentrația de substrat) utilizată. Peste o anumită concentrație de enzimă (pentru o concentrație fixă de substrat) dependența nu mai este liniară (fig. 2-A). Peste o anumită concentrație de substrat (pentru o concentrație fixă de enzimă) viteza de reacție nu mai crește (fig. 2-B).

Această viteză, care nu se mai modifică prin creșterea concentrației de substrat, se numește viteza maximă (V_{max}). Rezultatele noastre experimentale obținute pe un număr de peste 60 reacții enzimatice diferite, au indicat următoarea situație : efectele iradierii substratului apar cu atît mai evident în modificarea vitezei de reacție, cu cît se utilizează concentrații de enzimă mai mari, pentru concentrații de substrat la care se atinge viteza maximă (V_{max}).

B. PARAMETRII ENZIMATICI MACROSCOPICI t_m și τ

Rezultatul experimental fundamental al fenomenologiei de tip enzimatic descrisă de noi îl reprezintă creșterea vitezei reacțiilor enzimatice prin utilizarea substratelor iradiate cu lumină din domeniul vizibil $\lambda = 546$ nm. Această creștere apare ca o funcție periodică de *durata de iradiere a substratului*. În toate cazurile s-a observat că este necesar a iradia substratul un anumit timp minim, pentru a detecta prima creștere

a vitezei de reacție enzimatică. Acest prim timp de iradiere este numit parametrul t_m. Se observă apoi creșteri succesive ale vitezei de reacție enzimatică, induse de timpi de iradiere ai substratului delimitați între ei printr-o perioadă fixă. Vom numi acești timpi de iradiere care induc creșteri ale vitezei de reacție enzimatică *timpi eficienți*. Vom numi perioada

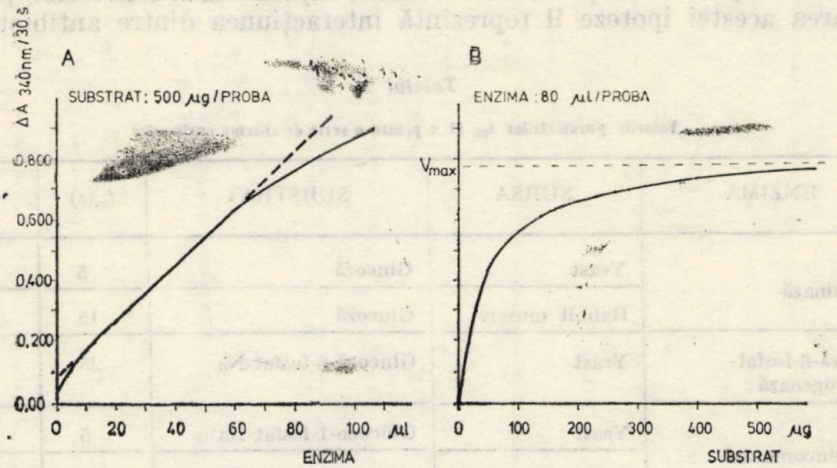


Fig. 2 *A.* — Dependența vitezei reacției glucozo-6-fosfat + glucozo-6-fosfat dehidrogenază de concentrația de enzimă. Mediu de reacție: glucozo-6-fosfat dehidrogenază (Calbiochem, yeast, A grade, 2000 UI/ml, diluată 20 µl/1,5 ml tampon), D-glucozo-6-fosfat $Na_2 \cdot 3\ H_2O$ (Serva), 500 µg/probă, NADP Na_2 (Merck) 500 µg/probă, soluție 0,2 M $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (Reactivul), tampon tris (Calbiochem, Ultrol)—HCl (UCB), pH 7,6, la un volum final de 3 ml. Tamponul s-a preparat zilnic și s-a menținut la o temperatură constantă de 26°C. Enzima, diluată zilnic, s-a păstrat la gheață. Restul reactivilor au fost menținuți la temperatura camerei. Reacția s-a făcut, la 26°C, în cuva spectrofotometrului Pye-Unicam SP 6-500, fiind inițiată cu substrat, dizolvat în apă tridistilată, la 26°C, urmărindu-se $A_{340nm}/30$ s. *B.* Dependența vitezei reacției glucozo-6-fosfat + glucozo-6-fosfat-dehidrogenază de concentrația de substrat.

fixă de timp care separă doi timpi eficienți parametrul τ [6]. Valoarea numerică a parametrilor t_m și τ depinde de natura enzimei și de originea sa biologică [7].

Se constată astfel că tranziția $P \rightarrow P^*$ *nu* are loc pentru *orice* timp de iradiere ci *numai* pentru timpii eficienți aparținînd șirului $t_1, t_2, \ldots \ldots t_n \ldots$ de timpi echidistanți $t_n - t_{n-1} = \tau$, $n \in \mathbf{N}$. Rezultatul surprinzător al acestei fenomenologii îl reprezintă faptul că valorile parametrilor t_m și τ pentru *toate* sistemele investigate de noi sînt *multipli de 5 secunde*. În cele ce urmează definim 5 s $\equiv$ ŧ. Dăm în figura 3 un exemplu tipic de creștere a vitezei de reacție enzimatică prin utilizarea de substrat iradiat, pentru sistemul: glucozo-6-fosfat (substrat) + glucozo-6-fosfat dehidrogenaza (enzimă).

Existența parametrilor macroscopici t_m și τ în sistemele enzimatice pare a fi o caracteristică generală a acestor sisteme. Dăm în tabelul 1 valorile acestor parametrii pentru o gamă largă de enzime, extrase din surse biologice diferite.

INVESTIGAȚIA RELAȚIEI ÎNTRE ANTIBIOTICELE IRADIATE ȘI CREȘTEREA BACTERIANĂ

În fenomenologia expusă mai sus s-au utilizat drept „senzori" pentru detectarea tranzițiilor $P \rightarrow P^*$ macromolecule biologice. Generalizînd, putem emite ipoteza că și celula intactă va fi capabilă să detecteze acest nou tip de tranziții fizice. Un model experimental convenabil pentru testarea acestei ipoteze îl reprezintă interacțiunea dintre antibiotice și

Tabelul 1

Valorile parametrilor t_m și τ pentru o serie de sisteme enzimatice

ENZIMA	SURSA	SUBSTRAT	$t_m(s)$	$\tau(s)$
Hexokinază	Yeast	Glucoză	5	20
	Rabbit muscle	Glucoză	15	30
Glucoză-6-fosfat-dehidrogenază	Yeast	Glucoză-6-fosfat-Na	25	20
Fosfoglucomutază	Yeast	Glucozo-1-fosfat-Na	5	20
	Rabbit muscle	Glucozo-1-fosfat-Na	20	30
L D H	Yeast	Piruvat-Na	5	20
		Lactat-Li	10	20
	Rabbit muscle	Piruvat-Na	5	30
		Lactat-Li	15	30
Alaninamino-transferază	Rat Liver	DL-alanină	15	30
Aspartatamino-transferază	Rat Liver	Acid DL-aspartic	15	30
Penicilinază	Bacillus cereus	Benzilpenicilină	15	20
	Bacillus subtilis niger	Benzilpenicilină	15	20
Malic dehidrogenază	Pig heart	L-malat-Na	25	35
	Yeast	Oxaloacetat-Na	10	20
		L-malat-Na	5	20
	Rabbit muscle	L-malat-Na	10	35
		Oxaloacetat-Na	15	35
Piruvat dehidrogenază	Yeast	Piruvat-Na	5	20
	Rabbit muscle	Piruvat-Na	10	30

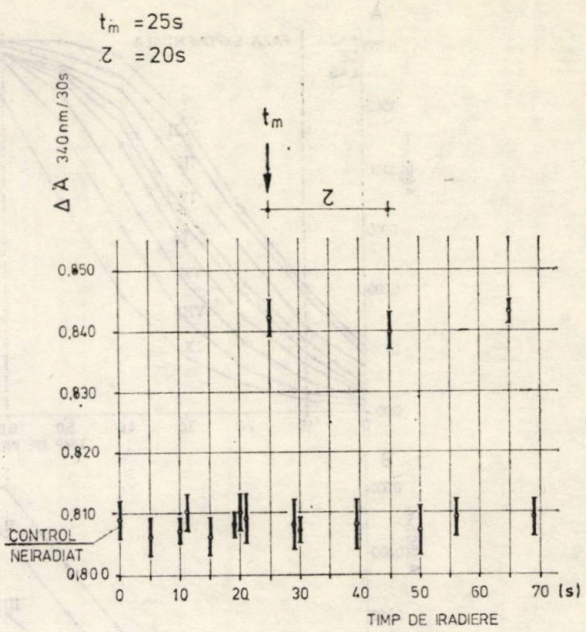


Fig. 3. — Parametrii t_m şi τ pentru sistemul glucozo-6-fosfat + glucozo-6-fosfat dehidrogenază (yeast). Condiţiile experimentale din fig. 2, enzimă diluată 80 µl/probă, substrat 500 µg/probă.

celulele bacteriene. Din farmacologia tradiţională se ştie că antibioticele se fixează şi reacţionează cu anumiţi receptori celulari specifici. Efectul lor asupra bacteriilor se manifestă prin inhibarea creşterii celulare (efect bacteriostatic) şi/sau prin dezintegrarea celulei (efect bactericid).

Fie următorul model experimental:

a) Antibiotic (A) + celulă bacteriană şi urmărirea unor parametri de creştere celulară $P_n(n = 1, 2 \ldots)$;

b) Inducerea unei tranziţii fizice în antibioticul A, prin iradiere cu $\lambda = 546$ nm, i.e. $A \rightarrow A^*$;

c) Antibiotic iradiat (A^*) + celulă bacteriană şi urmărirea aceloraşi parametri de creştere celulară $P_n^*(n = 1, 2, \ldots)$.

Ca şi în cazul fenomenologiei de tip enzimatic emitem ipoteza că $P_n^* \neq P_n(n = 1, 2, \ldots)$.

A. CINETICA CREŞTERII BACTERIILOR ÎN PREZENŢA ANTIBIOTICELOR

Ca şi în cazul enzimelor, detectarea efectelor de iradiere, induse în antibiotice prin urmărirea parametrilor de creştere bacteriană, este posibilă numai în anumite domenii ale cineticii respective. Din bacteriologia tradiţională se ştie că bacteriile, plasate într-un mediu de cultură (un amestec de substanţe nutritive) se multiplică rapid. Variaţia parametrilor de creştere în funcţie de timpul cît celulele se găsesc în mediul de cultură (numit timp de incubare) prezintă o formă caracteristică. În general, se observă o perioadă de stagnare, numită fază de lag, urmată de o creştere intensivă, numită fază exponenţială, terminată printr-o a doua fază de stagnare, numită fază staţionară (fig. 4-*A*). Forma curbelor de creştere — pentru un mediu de cultură ales — depinde de natura celulei bacteriene şi de numărul de celule cu care se iniţiază creşterea (numit inocul).

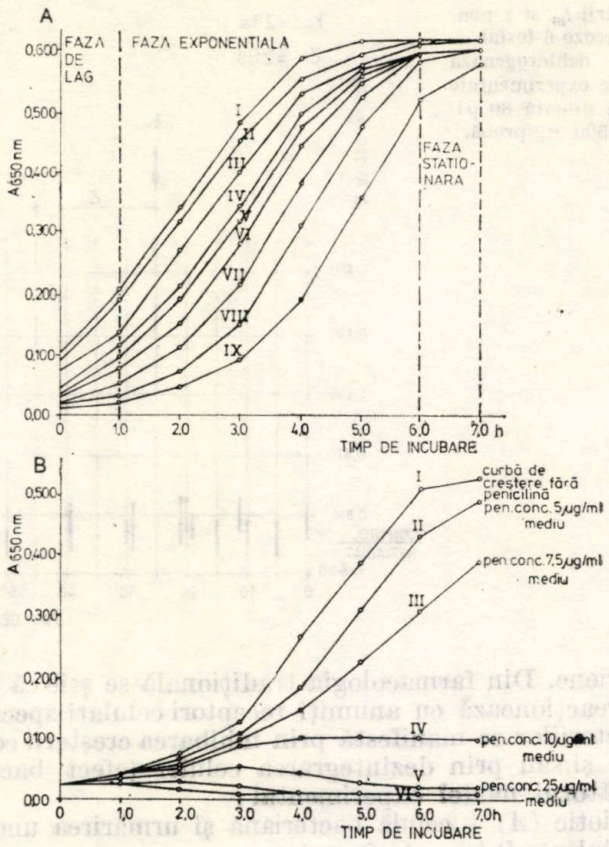


Fig. 4 A. — Curbe de creștere a unei tulpini E. coli (K 12), la 28°C. Prin cultură bacteriană am considerat o clasă de celule cu proprietăți similare. Condiții experimentale : mediu lichid tip Pennasay — utilizat pentru curbe de creștere — Bacto Beef extract (Difco) 1,5 g%, Bacto Yeast Extract (Difco) 1,5 g%, Bacto Peptonă (Merck) 5 g%, Bacto Dextroză (Difco) 1 g%, NaCl (Merck) 1,75 g%. K_2HPO_4 (Merck) 1,83 g%, KH_2PO_4 (Merck) 0,66 g%. Inoculul a fost preparat dintr-o cultură bacteriană de 18 h. Incubarea s-a făcut la 28°C, în tuburi de spectrofotometru Bausch & Lomb, la un volum final de 3 ml. Creșterea s-a exprimat în unități de absorbție, citirea făcîndu-se din oră în oră, pe spectrofotometru Bausch & Lomb, la $\lambda = 650$ nm. Absorbția inițială A_0, curba *I* = 110 UA (unități absorbție) ; *II*, $A_0 = 95$ UA ; *III*, $A_0 = 75$ UA ; *IV*, $A_0 = 50$ UA ; *V*, $A_0 = 40$ UA ; *VI*, $A_0 = 35$ UA ; *VII*, $A_0 = 25$ UA ; *VIII*, $A_0 = 20$ UA ; *IX*, $A_0 = 15$ UA.

***B.* Inhibarea creșterii unei tulpini E. coli (K 12), în funcție de variația concentrației de penicilină (Serono, RFG, 10^6 UI/flacon). Antibioticul este dizolvat în 2 ml apă tridistilată, introducîndu-se în tubul de cultură volumul cerut pentru realizarea concentrației de antibiotic necesare.**

Păstrîndu-se riguros condiţiile iniţiale ale curbei de creştere — martor (inocul, mediu de cultură, temperatură de incubare) se realizează o serie de curbe de creştere diferite, fiecare avînd în mediu o cantitate fixă de antibiotic (fig. 4—*B*). Concentraţia de antibiotic care realizează — pentru un timp de incubare dat — o inhibiţie de 50% a creşterii bacteriene, se notează cu DI_{50}. Pentru detectarea efectelor iradierii antibioticelor asupra creşterii bacteriene, inoculul se alege relativ diluat (A_0 între 0,025 —0,050 UA). Creşterea culturii martor se realizează astfel ca faza exponenţială să apară între 3 şi 6 ore de incubare. Antibioticul se adaugă în concentraţii pentru care se realizează, aproximativ, DI_{50}. Diferenţele între creşterea culturilor bacteriene în prezenţa unui antibiotic iradiat faţă de aceleaşi creşteri în prezenţa antibioticului neiradiat, se observă cel mai clar în faza de creştere exponenţială.

B. PARAMETRII CELULARI MACROSCOPICI t_m ŞI τ

Rezultatul experimental fundamental al fenomenologiei de tip celular descrisă de noi, îl reprezintă creşterea activităţii antibioticelor prin iradierea lor cu lumină din domeniul vizibil ($\lambda = 546$ nm). Se constată şi în acest caz că tranziţia $P \rightarrow P^*$ *nu* are loc pentru *orice* timp de iradiere, ci *numai* pentru anumiţi timpi eficienţi, care sînt şi de data aceasta de tipul 5 k s ($k = 1, 2, \ldots$). Valoarea numerică a parametrilor celulari t_m şi τ depinde de natura celulei bacteriene. Dăm în figura 5 un exemplu tipic de creştere a activităţii penicilinei iradiate asupra unei populaţii de bacterii *Escherichia Coli*.

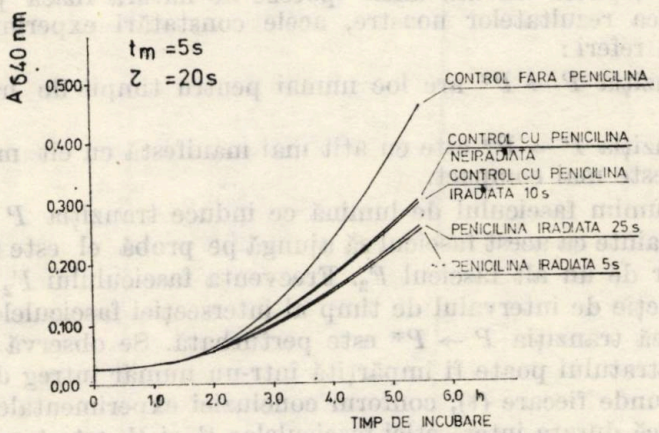


Fig. 5. — Parametrii t_m şi τ pentru sistemul E. coli + penicilină.

Ca şi în cazul sistemelor enzimatice, existenţa parametrilor macroscopici t_m şi τ în sistemele celulare pare a fi o caracterisitcă generală a acestora. În tabelul 2 se dau valorile acestor parametri pentru o gamă largă de antibiotice, testate pe tulpini bacteriene diferite.

Tabelul 2

Valorile parametrilor t_m și τ pentru o serie de sisteme celulare.

CELULA	ANTIBIOTIC	$t_m(s)$	$\tau(s)$
E. Coli	Penicilină	5	20
	Oxacilină	5	20
	Canamicină	5	20
	Streptomicină	5	20
	Colimicină	10	20
	Cloramfenicol	10	20
	Gentamicină	15	15
Yeast (S. cerevisiae)	Tetraciclină	10	20
Staphylococcus albis	Gentamicină	15	15
	Oxacilină	5	20

COMENTARII DE NATURĂ FIZICĂ

Pentru a putea discuta unele ipoteze de natură fizică prezentăm, din totalitatea rezultatelor noastre, acele constatări experimentale, la care ne vom referi:

1. Tranziția $P \rightarrow P^*$ are loc numai pentru timpii de iradiere eficienți.

2. Tranziția $P \rightarrow P^*$ este cu atît mai manifestă cu cît monostratul de substrat este mai compact.

3. Denumim fasciculul de lumină ce induce tranziția $P \rightarrow P^*$ fasciculul F_1. Înainte ca acest fascicul să ajungă pe probă el este intersectat perpendicular de un alt fascicul F_2. Frecvența fasciculului F_2 este arbitrară. În funcție de intervalul de timp al intersecției fasciculelor F_1 și F_2 se constată că tranziția $P \rightarrow P^*$ este perturbată. Se observă că durata iradierii substratului poate fi împărțită într-un număr întreg de „porții" de cîte 5 secunde fiecare ($\mathfrak{t}$), conform concluziei experimentale 1. Atunci, presupunînd că durata intersecției fasciculelor F_1 și F_2 este t, așa ca $0 < t < \mathfrak{t}$, distingem cazurile:

a) Dacă intervalul de timp al intersecției fasciculelor F_1 și F_2 este plasat în aceeași „porție" de cinci secunde (fig. 6-*A*), atunci tranziția $P \rightarrow P^*$ se atenuează pînă la dispariție.

b) Dacă intervalul de timp al intersecției fasciculelor F_1 și F_2 este plasat în două „porții" adiacente (fig. 6—*B*) atunci tranziția $P \rightarrow P^*$ dispare complet.

4. Dacă apa folosită la dizolvarea substanței iradiate este supusă în prealabil unui proces de ultrasonare (60 s; 0,5 W cm^{-2}; 0,8 MHz), atunci tranziția $P \rightarrow P^*$ nu mai poate fi sesizată.

Concluzia experimentală 1 ne-ar putea conduce la o interpretare clasică a tranziției $P \rightarrow P^*$. Fie următorul model din mecanica cuantică

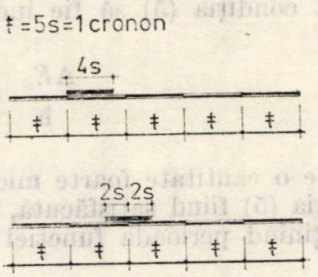


Fig. 6. — Reprezentarea schematică a intervalului de iradiere a substratului și a intervalului de intersecție a fasciculelor.
A. Intervalul de intersecție este plasat în întregime în același cronon;
B. Intervalul de intersecție este plasat în doi crononi vecini.

tradițională. Un sistem fizic supus unei perturbații dependente de timp suferă o tranziție $i \rightarrow f$ (i este starea inițială, iar f este starea finală). Această trzniție este caracterizată de variația de energie $\Delta E = E_f - E_i$ (E_i este energia în starea inițială, E_f este energia în stare finală). Dacă perturbația este periodică în timp cu frecvența ω și dacă

$$\frac{\Delta E}{\hbar} \approx \omega \qquad (5)$$

atunci probabilitatea de tranziție, $\mathfrak{P}_{i \rightarrow f^*}$, este funcție periodică de timp. În cazul iradierii substratului cu lumină starea inițială (i), este P iar cea finală (f) este P^*. O măsură a probabilității de tranziție $\mathfrak{P}_{P \rightarrow P^*}$ este *creșterea* vitezei reacției enzimatice, $\Delta V = V(P^*) - V(P)$. Această cantitate, conform concluziei experimentale 1, apare ca o funcție periodică de timp, cu perioada τ. Se pare deci că modelul prezentat mai sus ar putea explica tranziția $P \rightarrow P^*$. Totuși, faptul că τ este pentru orice cuplu enzimă-substrat un multiplu de 5 secunde nu reiese din modelul perturbației periodice în timp. Pe de altă parte, spectrul energetic al cristalului este de așa natură încît condiția (5) nu poate fi îndeplinită. Pentru înlăturarea acestor inconsistențe sugerăm o serie de interpretări posibile.

a) IPOTEZA „BIOSPINULUI"

În afara mărimilor clasice, substratul enzimatic mai este caracterizat de o mărime fizică, B, energetic atașabilă cîmpului electromagnetic $F^{\mu\nu}(\mu, \nu \in \{0, 1, 2, 3, ..\})$. Urmînd o idee a lui R. Rosen [8], am sugerat că această mărime să fie numită observabilă biologică [4]. Pentru a putea

fi legată de $F^{\mu\nu}$, observabila B se reprezintă printr-un operator cu 16 componente, $B_{\mu\nu}$. În acest caz hamiltonianul de perturbație este

$$\mathcal{H}_B = g\, B_{\mu\nu} F^{\mu\nu}. \tag{6}$$

Dacă E_B sînt valorile proprii ale lui $\mathcal{H}_B$, atunci constanta g se ajustează astfel încît condiția (5) să fie îndeplinită. Adică

$$\frac{\Delta E_B}{\hbar} + \varepsilon = \omega \tag{7}$$

unde ε este o cantitate foarte mică.

Relația (5) fiind satisfăcută, putem aplica modelul perturbației periodice obținînd perioada funcției $\mathfrak{L}_{P\to P^*}$

$$\tau = \frac{\pi}{\sqrt{\frac{\varepsilon^2}{4} + \frac{|<P^*|\mathcal{H}_B|P>|^2}{\hbar^2}}} \tag{8}$$

iar

$$t_m = \frac{\tau}{2} \tag{9}$$

Sugerăm denumirea de „biospin" pentru observabila biologică, din două motive. Pe de o parte, din consecința experimentală 2, rezultă că tranziția $P \to P^*$ se bucură de inductivitate, la fel ca magnetismul. Pe de altă parte, pentru ca $\mathcal{H}_B$ să fie un scalar pur, din cauză că $F^{\mu\nu}$ este un tensor antisimetric, trebuie ca și $B_{\mu\nu}$ să fie un tensor antisimetric, care poate fi interpretat drept spin.

În final subliniem că deși pentru multe perechi enzimă-subtrat $t_m = \frac{\tau}{2}$, relația nu este valabilă în general.

De asemenea deducerea faptului că timpii eficienți sînt multipli de t, utilizînd relațiile (8) și (9) rămîne o problemă deschisă.

b) IPOTEZA UNIVERSALITĂȚII BIOSPINULUI

Din concluzia experimentală 4, rezultă că în reacția enzimatică, apa joacă un rol deosebit. Fie Q complexul rezultat în urma restructurării apei pe substratul enzimatic și P' produsul final rezultat în urma reacției în care participă Q și enzima (MB). Fie $P^{*\prime}$ și Q^* produșii corespunzători în cazul în care în reacție P este înlocuit cu P^*. Simbolic aceste reacții se scriu :

$$P/P^* + H_2O \to Q/Q^* \tag{10 a}$$

$$Q/Q^* + (MB) \to P'/P'^* \tag{10 b}$$

Din concluzia experimentală 4 rezultă că :

$$P/P^* + H_2O \text{ (ultrasonată)} \rightarrow Q \qquad (11)$$

În general, pentru ca două sisteme să interacţioneze este necesar ca :

— primo — ambele sisteme să fie caracterizate de mărimea relevantă interacţiei şi

— secundo — valorile acestei mărimi să fie într-un anumit raport, adică să fie realizate anumite „reguli de selecţie", pentru obţinerea unei anumite stări a sistemului rezultat.

Ţinînd cont de prima din aceste condiţii şi de relaţia (10 a) rezultă că şi *apa trebuie să dispună de biospin, sau cel puţin trebuie să aibă o asemenea „prestructură" capabilă de interacţie cu biospinul.* Vom numi această proprietate a apei, proprietate *CB* (cuplare cu biospinul). Luînd în considerare reacţia (11), rezultă că pentru apa ultrasonată are loc o modificare a proprietăţii *CB*.

Tranziţia $P \rightarrow P^*$ este rezultatul iradierii substratului enzimatic, care este un proces electromagnetic de interacţie între fotoni şi substrat, cu alte cuvinte şi fotonii trebuie să se bucure de proprietatea *CB*. Cum reacţia (10 a) este tot un proces electromagnetic, generalizăm emiţînd ipoteza că interacţiunea de tip *CB* dublează interacţiunea electromagnetică. Această interacţiune este rar sesizată, probabil, din cauză că în majoritatea cazurilor, $B_{\mu\nu} = 0$ sau „regulile de selecţie" sînt foarte rar satisfăcute.

c) IPOTEZA CRONONULUI

Concluzia experimentală 3 nu poate fi explicată în contextul modelului perturbaţiei periodice. Într-adevăr, fasciculul F_1 iluminează substratul un timp suficient pentru ca tranziţia $P \rightarrow P^*$ să aibă loc, chiar dacă simultan fasciculul F_1 este intersectat de fasciculul F_2. Deci dispariţia sau atenuarea tranziţiei $P \rightarrow P^*$ nu este justificată de modelul perturbaţiei periodice. Rezultă însă că, în urma intersecţiei fasciculelor F_1 şi F_2 proprietatea *CB* a fotonilor fasciculului F_1 se modifică. Surprinzător, această modificare este funcţie de timp aşa cum rezultă din concluzia experimentală 3. Prin urmare, împărţirea duratei de iradiere în „porţii" de cîte 5 secunde (t) nu este convenţională. Fiecare asemenea „porţie" are o structură bine determinată, iar toţi timpii eficienţi sînt alcătuiţi dintr-un număr întreg de asemenea „porţii".

Apare astfel ideea „particulelor de timp", pentru care sugerăm termenul de *crononi* (fiecare avînd 5 secunde = t). O teorie a interacţiunii între crononi şi fotoni, sau mai general o descriere „crononică" a interacţiilor electromagnetice este încă nefondată. Cu toate acestea au fost făcute descrieri crononice ale stărilor sistemelor enzimă-substrat, cu ajutorul cărora enzimele au fost împărţite în trei clase [9] :

A. enzime de tip „sus", dacă $t_m = (2k + 1)\,\mathfrak{t}$ şi $\tau = 2k'\mathfrak{t}$

B. enzime de tip „jos", dacă $t_m = 2k\,\mathfrak{t}$ şi $\tau = 2k'\mathfrak{t}$

C. enzime de tip „sus-jos", dacă $\tau = (2k' + 1)\mathfrak{t}$

unde $k, k' \in \mathbf{N}$.

Cu ajutorul unei descrieri asemănătoare în care enzimele au fost împărţite în două clase a fost derivată o formulă ce generează toţi timpii eficienţi

pentru orice sistem enzimă-substrat

$$T_{\alpha;\beta;\rho} = (\alpha + \beta\rho)\,t \qquad (12)$$

În relația (12), $\alpha \in \{1, 2, 3, \ldots\}$, $\beta \in \{0, 1,2, \ldots\}$ și $\rho \in \{1, 2, 3, \ldots\}$. Șirul timpilor eficienți pentru un sistem determinat este dat de α și ρ, corespunzînd parametrilor t_m și τ.

Relația (12) sugerează aspectul formulei spectroscopice Balmer, subliniind încă o dată ideea unei „spectroscopii biologice".

Evident, în afara sugestiilor *a*, *b* și *c* există și alte interpretări posibile ale fenomenologiei descrise. În contextul de față însă, ipoteza crononului ni se pare cea mai naturală, ca urmare a evidențelor experimentale rezultate din constatarea 3.

Prezentat la redacție
la 16 iunie 1979

*Disciplina de Biochimie—
Fundeni. IMF—București*

SUGGESTIONS FOR A BIOLOGICAL SPECTROSCOPY

SUMMARY

We have observed that the irradiation of enzymes substrates with visible light, $\lambda = 546$ nm induces enhancements of the enzyme reaction rate.

This effect appears as a periodic function of the substrate irradiation time. One records a minimum irradiation time, termed the t_m-parameter, which induces the first enhancement of the enzyme reaction and a fixed time period, termed the τ-parameter, which delimits two successive effects. All of the numerical values of the t_m and τ -parameters appear as multiple of 5 s.

We have observed that when the water used to solve the irradiated material is previously treated with ultrasounds ($\nu = 0.8$ MHz), the effect induced by the respective irradiated substrate in the enzyme reaction is abolished. We have advanced the idea that bulk water possesses a yet unknown characteristic, which we have termed "prestructure".

We have observed that when the $\lambda = 546$ nm beam used to irradiate the substrate is intersected with another light beam, the effect induced in the irradiated substrate is wiped off. This surprising phenomenon, independent of the interesecting beams frequency, suggests a completely new type of photon-photon interaction. This interaction appears sharply time quantized in "packages" of 5 s.

We have suggested a new property, the "biospin", correlated in the irradiated substance and in the light, to account for these experimental data. We have also advanced the idea of a "time-particle", which we have termed "chronon".

BIBLIOGRAFIE

1. V. Weisskopf, *Physics in the twentieth century*: Selected Essays, MIT-Press, Cambridge, p. 47 (1972).
2. S. Comorosan, Bull. Mathem. Biol., **31**, 419 (1975).
3. A. Stimson, *Photometry and Radiometry for Engineers*, John Wiley & Sons, New York (1974).
4. S. Comorosan, *Biological observables*, in Progress in Theoretical Biology, ed. R. Rosen, Academic Press, New York, p. 161 (1976).
5. S. Comorosan, Int. J. Quantum Chem: Quantum Biol. Symp. **1**, 221 (1974).
6. S. Comorosan, S. Vieru, P. Murgoci, Biochim. Biophys. Acta, **228**, 620 (1972).
7. S. Comorosan, D. Crişan, E. Alexandrescu, P. Murgoci, Physiol Chem. & Physics, **4**, 559 (1972).
8. R. Rosen, Bull. Math. Biophys, **22**, 227 (1960).
9. S. Comorosan, M. Hristea, P. Murgoci, Bull. Math. Biology, (in press).

RECENZII

Red cell rheology (*Reologia celulelor roşii*), Editată de M. Bessis, S. B. Shohet şi N. Mohandas, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1978, 438 p., 200 fig., 36 tabele.

Lucrările din această carte au fost prezentate la simpozionul de reologie, ţinut la Institutul de Patologie Celulară, spitalul Bicêtre, Franţa, iulie 16—18, 1976.

Autorii articolelor publicate în această carte sînt cercetători cu renume mondial din Suedia, R. F. G., Anglia şi majoritatea din S.U.A. Cartea cuprinde două părţi şi fiecare parte cîte trei secţiuni.

În partea întîi în prima secţiune intitulată *Metode pentru evaluarea deformabilităţii celulelor roşii* sînt expuse studiile efectuate asupra reologiei intravasculare a eritrocitelor la om; tehnici de măsurare a deformaţiei celulelor roşii aspirate prin orificii mici într-o sită de policarbonat şi compararea cu alte metode; principii de bază ale testului de filtrabilitate pentru analiza comportării la curgere a suspensiilor concentrate de eritrocite spălate; principii şi tehnici pentru evaluarea deformabilităţii eritrocitelor, tehnici viscozimetrice şi reologia sîngelui.

În secţiunea a 2-a, a părţii I, intitulată *Bazele biochimice ale conformaţiei celulelor roşii şi deformabilitatea* sînt de menţionat lucrările referitoare la: rolul posibil al fosforilării proteice în membrană, controlul conformaţiei eritrocitului (procesele de fosforilare şi defosforilare, substratele proteice, activitatea proteinkinazei, a protein fosfatazei etc.); proteinkinaza celulelor roşii umane la subiecţii normali şi pacienţii cu sferocitoză ereditară; rolul proteinkinazei (enzimă care catalizează transferul fosfatului terminal al ATP pe un receptor proteic) din celulele roşii în structura şi funcţia eritrocitului; rolul prezenţei ATP intracelular asupra menţinerii aspectului şi deformabilităţii celulelor roşii umane; efectul modificării proteice asupra proprietăţilor mecanice ale membranei eritrocitare, în care autorii ajung la concluzia că agregarea protein membranei determinată de starea de fosforilare a spectrinei şi actinei poate să afecteze proprietăţile intrinsece ale membranei.

Secţia a 3-a intitulată *Aplicaţii clinice* cuprinde mai multe articole dintre care citãm: *Anemia sferocitică indusă de anticorpi*, schimbări în deformabilitatea celulelor roşii în anemiile hemolitice evaluate prin metode difractometrice.

Partea a 2-a a cărţii prezintă atît aspecte ale reologiei celulelor roşii sub formă de seceră cît şi diverse teorii generale ale conformaţiei celulelor roşii, structură şi reologie.

Cartea aduce un bogat material experimental şi documentar privitor la reologia celulelor roşii şi interesează pe specialiştii hematologi, pe medici şi biochimişti.

Natalia Moldoveanu

Current topics in microbiology and immunology (*Probleme curente în microbiologie şi imunologie*) Vol. 83, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1978, 158 p., 13 fig.

Acest volum cuprinde trei articole. Primul articol se intitulează *Ereditatea şi expresia genelor, la găini, care sînt înrudite cu genele virusului Sarcomului Leucozei aviare.* Se descriu grupele diferite ale Retrovirusurilor Aviare, gazdele pentru $AlSV_s$ endogen, nomenclatura pentru $AlSV_s$ endogen. Au fost găsite şase fenotipuri diferite la găini pentru expresia $ALSV_s$ endogen. Trei dintre acestea exprimă titlurile caracteristice ale antigenelor care sînt înrudite celor găsite în $ALSV_s$, în absenţa producerii virusului. Expresia acestor trei fenotipuri este aceeaşi în celulele care sînt sau nu sînt susceptibile la virusul E. Doi dintre fenotipi, ambii

numiți V—E^+ produc spontan infecții ale virusului subgrupei E. Celulele unui fenotip V—15^+ produce spontan particule asemănătoare virusului dar care nu aparțin subgrupei E. Expresia fenotipului V—15^+ ste aceeași atit în celulele susceptibile cit și în cele rezistente la virusul E. În continuare se prezintă expresia celulară a antigenelor înrudite cu antigenele specifice de grup și DNA polymeraza RNA dependentă din $ALSV_8$; activitatea biologică a sub grupului E, ILV_8 și RAV—O_8; genonul RAV—O. Citez citeva aspecte din capitolul cu privire la expresia genelor virale endogene: transcrierea și translația genelor virale endogene, controlul transcriptional și post-transcriptional al expresiei genelor ALSV, sinteza RNA viral, genele virale endogene inductibile și neinductibile. În ultimele capitole se expun date cu privire la răspunsul imun al găinilor față de antigenele virale endogene, relația între $ALSV_8$ endogen și cancer precum și rolul $ALSV_8$ în celulele normale de găină. Al doilea articol se ocupă de RNA polymeraze din *Escherichia coli*. Ca și în organismele superioare această enzimă este prezentă ca avînd o structură formată dintr-un număr de subunități polipeptidice, lucru care vine în contrast cu RNA polymeraza care se găsește într-o serie de fagi virulenți iar ca structură are un singur lanț polipeptidic. Se comentează în continuare rolul subunităților individuale, importanța modelului structural, inițierea transcrierii, controlul pozitiv și negativ la inițiere, sfîrșitul transcrierii, reglarea sfîrșitului, activitatea RNA polymerazei ca o funcție a stării metabolice celulare, cuplarea între transcriere și translație, antibioticile specifice pentru RNA polymerază, implicarea sintezei RNA în replicarea DNA, sinteza și asamblarea RNA polymerazei. Articolul se încheie cu un capitol de concluzii după care urmează 500 indicații bibliografice. În al treilea articol al volumului s-a încercat să se coreleze proprietățile structurale și replicative ale Colicin E_1 Plasmidei. S-a observat că doar o porțiune limitată a Col E_1DNA este esențială pentru menținerea plasmidei. S-a determinat structura primară a acestei „regiuni replicative". Originea acesteia este localizată într-o regiune intercistronică și poate reprezenta o zonă de terminare a transcripției. O serie de studii biochimice ale replicării plasmidei pun în evidență intermediarii timpurii ai replicării precum și terminația replicării. Articolul se încheie cu concluzii și 12 pagini de trimiteri bibliografice cu privire la acest subiect.

Lucia Buzilă

E. FREERKSEN, I. TARNOK și J. H. THUMIN, *Genetics of the Actinomycetales (Genetica Actinomycetalelor)*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1978, 278 p., 85 fig., 116 tab., DM96.

Acest volum cuprinde lucrările prezentate la tradiționalul colocviu ținut la Borstel, în R. F. Germania, între 29 septembrie—1 octombrie 1976, colocviu avînd ca tematică genetica actinomicetelor.

Lucrările în funcție de problemele fixate au fost grupate în 5 capitole mai importante:

— primele trei capitole sînt axate pe aspecte de genetică la Streptomyces, la Mycobacterium și respectiv la Nocardia;

— capitolul al patrulea cuprinde studii de reasociere DNA—ADN iar ultimul capitol este dedicat lucrărilor asupra actinofagilor.

Este pentru prima dată cînd sînt tratate împreună, într-un mod direct aspecte de sistematică, patologie, antibiotice, reglare enzimatică, recombinare genetică, cartare genică și plasmide la genurile Streptomyces, Mycobacterium și Nocardia.

În cadrul problemelor de genetică la Streptomyces lucrările prezentate au fost axate pe următoarele direcții mai importante:

— plasmidele; controlul genetic al producției de antibiotice;

— controlul genetic al sintezei enzimatice;

— recombinare genetică și cartare genică.

În capitolele de genetică la Mycobacterium și Nocardia sînt lucrări ce tratează aspectele genetice ale rezistenței la drog a lui M. smegmatis, recombinare genetică și cartare genică la Mycobacterium și Nocardia, reglarea activităților enzimatice la Nocardia erythropolis.

Interesante sînt și lucrările prezentate în cadrul capitolului dedicat actinofagilor, lucrări ce cuprind:

— studiul morfologic, relațiile serologice și spectrul de gazdă al 20 actinofagi;

— lisogeni și controlul lizogenilor la Mycobacterium.

Prin tematica lucrărilor prezentate, prin ținuta științifică deosebită a acestora, prin ținuta grafică îngrijită, volumul dedicat geneticii la actinomicete este un prețios îndreptar pentru cercetătorii din acest domeniu de lucru.

Ioan Moisa

Current topics in microbiology and immunology (*Probleme în microbiologie și imunologie*) Vol. 84, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New-York, 1978, 120 p., 2 figuri.

Acest volum cuprinde un articol cu tehnici pentru separarea și selecția limfocitelor antigen specifice. Metodele descrise se bazează pe legarea antigenului sau reacția față de antigen. Sistemul imun constă dintr-o mulțime complexă de celule în diferite stadii de diferențiere și forme de specializare. Multe subpopulații diferite de limfocite au fost diferențiate datorită proprietăților lor fizice, biochimice, fiziologice și funcționale. Există două clase majore de limfocite : celule B și celule T. Repertoriul receptorilor pentru antigen pe celulele mature ale ambelor clase este foarte diferit, fiecărei celule individuale și descendenților săi fiindu-le încredințat să sintetizeze molecule cu zone de combinare identice ale antigenului. Această restricție în specificitate a fost arătată în teoria selecției clonale și a fost prima oară demonstrată la nivelul celulelor secretoare de anticorpi și mai tîrziu de asemenea la nivelul limfocitelor nestimulate. Tehnicile care permit eliminarea sau izolarea celulelor care exprimă receptori specifici furnizează cele mai multe date experimentale convingătoare pentru teoria selecției clonale. Se descriu în această carte următoarele tehnici : I. *Izolarea sau eliminarea limfocitelor care exprimă receptori specifici* ; II. *Selecția pozitivă și negativă a limfocitelor antigen reactive in vivo or in vitro* ; III. *Izolarea clonelor de limfocite in vivo sau in vitro.* Aceste tehnici au fost aplicate în multe studii cu privire la natura receptorilor antigenici a limfocitelor T și B și în studii de activare, creștere și diferențiere a limfocitelor antigen specifice. Se discută și se arată părțile bune ale diferitelor tehnici precum și dificultățile și limitele care adesea au fost diminuate. Aceasta îl va ajuta pe cititor să-și aleagă sau să-și extindă tehnica care i se potrivește mai bine scopului său. Articolul prezintă la sfîrșit 600 indicații bibliografice referitoare la această problemă. Avînd în vedere subiectul foarte interesant al acestui volum el poate fi de un real ajutor experimental tuturor cercetătorilor, medicilor, imunologilor, biochimiștilor și biologilor care lucrează în acest domeniu.

Lucia Buzilă

Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, nr. 82, Ed. R. H. Adrian, E. Helmreich, H. Holzer, R. Jung, O. Krayer, R. J. Linden, F. Lynen, P. A. Miescher, J. Püper, H. Rosmunssen, A. E. Renold, U. Trendelenburg, K. Ullrich, M. W. Vogt, A. Weber, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978, 214 pag., 43 fig.

Cartea cuprinde trei articole de ansamblu asupra unor probleme importante de biochimie. Primul se referă la receptorii pentru catecolamine în care autorul, Alexander Levitzki, prezintă o clasificare a acestor receptori și a semnalelor biochimice cuplate de aceștia, folosirea liganzilor specifici pentru detectarea receptorilor atît *in vitro* cît și *in vivo* și autoreglarea receptorilor β-adrenergici. Autorul conclude că pe baza datelor actuale, în cîțiva ani, se va elucida mecanismul de acțiune al receptorilor β-adrenergici și se vor face progrese în domeniul receptorilor α-adrenergici și ai celor pentru dopamină. Al doilea articol, scris de G. Schreiber și J. Urban, se ocupă de sinteza și secreția albuminei, insistînd asupra locului și mecanismului de sinteză, a cineticii și reglării secreției. În final autorii discută despre funcția oligopeptidelor suplimentare prezente în proteinele precursoare. În al treilea articol, autorul W. Almers, prezintă problema curenților de poartă și a deplasărilor de sarcină în membranele excitabile. Fiecare articol este însoțit de o bibliografie amănunțită. Aceasta împreună cu indicele de subiecte și de autori facilitează informarea rapidă a cititorului în problema vizată.

Doina Onică

Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology, vol 85. *Ergebnisse der physiology, biologischen chemie und experimentellen pharmakologie* (*Referate în fiziologie, biochimie și farmacologie*, vol. 85. *Rezultate ale fiziologiei, chimiei biologice și farmacologiei experimentale*), Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 1979, 231 pag., 64 figuri.

Prezentul volum din seria *Referate în fiziologie, biochimie și farmacologie* cuprinde trei lucrări cu caracter monografic. Prima, intitulată *Orientarea animalelor în spațiu și timp* de M. Lindauer (în limba germană cu un larg sumar în limba engleză) se ocupă de problema

orientării la animale. Orientarea, în sens biocibernetic se poate trata ca un sistem reglator cu valoare de adaptare. Procesul de recunoaștere a formelor (pattern recognition) este analizat din punctul de vedere al organelor de simț cît și al activităților complexe la nivelul sistemului nervos central. Numai după parcurgerea tuturor treptelor de recepție și analiză, ,,ținta'' devine clară.

După observarea formei prin filtrarea detaliilor neimportante, clasificarea similarităților, sinteza contururilor, determinarea poziției relative a punctelor celor mai relevante, este analizată mișcarea ,,ținței''. Informațiile sînt comparate cu cele deja stocate în memorie și se stabilește identitatea ,,ținței'' cu utilizarea unor mecanisme adiționale de corecție care filtrează diferențele în culoare, proporție, poziție de observare etc.

Făcîndu-se uz de cunoștințe de fizică (optică, magnetism, electricitate), neurologie, cibernetică se tratează procesul complex al orientării și pe exemple concrete (animale cu diferite tipuri de ,,ținte'') : albine, păsări, insecte. Sînt discutate mai multe mecanisme de orientare în funcție de cîmpul magnetic terestru, cîmpul gravitațional, lumină polarizată, poziția soarelui, stimuli chimici (miros), ecou.

Cercetarea în acest interesant domeniu a adus multe contribuții la înțelegerea unor procese de importanță vitală. Orientarea este un proces de prelucrare multimodală a informației în care învățarea are un rol aparte. Lucrarea, documentată la zi, este deosebit de interesantă și dincolo de un interes strict profesional.

A doua lucrare, intitulată *Proprietățile biologice și detecția complexelor imune în patologia animală și umană* (în limba engleză) este semnată de U. E. Nydegger de la Universitatea din Geneva. După o scurtă tratare a imunochimiei antigenelor și proprietăților biologice a anticorpilor, se insistă asupra imunochimiei complexelor imune, implicațiilor imunopatologice a complexelor imune avîndu-se în vedere interacțiile dintre acestea și receptorii hormonali precum și receptorii de pe suprafața celulară.

Un capitol special este consacrat detecției și caracterizării imunocomplexelor iar capitolul final se referă la patologia acestora. Lucrarea, cu literatura adusă la zi, este de recomandat specialiștilor din domeniu.

A treia lucrare din volumul prezent, intitulată *Patofiziologia circulației enterohepatice a acizilor biliari* (în limba engleză) este semnată de S. Matern și W. Gerok de la Universitatea din Freiburg. Lucrarea trece în revistă cunoștințele referitoare la biosinteza acizilor biliari, metabolismul acestora, reglarea biosintezei în condiții normale și de boală, formarea bilei, absorbția intestinală a acizilor biliari și metabolizarea lor la acest nivel, abnormalități ale metabolismului acizilor biliari în bolile intestinale, transport spre ficat, aspecte cantitative și dinamica circulației enterohepatice a acizilor biliari. Lucrarea are caracter orientativ, problemele sînt tratate pe relativ puține pagini față de complexitatea lor. Acest fapt este compensat prin indicarea unui mare număr de surse bibliografice (lista bibliografică se întinde pe 21 pagini cu aproximativ 25 titluri pe pagină). Lucrarea, tocmai prin caracterul său, poate fi de mare utilitate atît biochimiștilor cît și medicilor.

Volumul se încheie cu un index de autori și o bogată listă de cuvinte cheie.

Gabriela Angel

Handbuch der Inneren Medizin, 2 band. *Blut und Blutkrankheiten*, teil 6. *Leukämien* (*Tratat de medicină internă*, vol 2 : *Sîngele și bolile sîngelui* partea 6. *Leucemii*) edit. H. Begemann, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978, 635 pg., 77 fig. 31 tab., US $ 242,00

Progresul pe care l-a cunoscut hematologia în ultimele decenii a permis înțelegerea bazei teoretice și a formelor de manifestare a multor boli printre care leucemia. Cunoștințele acumulate referitor la diferitele forme de leucemie și problemele legate de terapie au depășit de demult limitele unei singure cărți. Prezenta carte este parte a unei serii de publicații referitoare la leucemii. Cartea insistă pe prezentarea amănunțită a bazelor teoretice a problemelor tratate. Intenția declarată a autorului este de a prezenta materialul de așa manieră încît să rezulte în mod logic procedeul terapeutic cel mai indicat.

Primele patru din cele opt capitole ale cărții se ocupă de definiția, istoricul, epidemiologia și etiologia leucemiei, biochimia celulelor leucemice. Un capitol special este consacrat metabolismului energetic și de carbohidrați al celulei leucemice.

Următoarele patru capitole sînt consacrate descrierii amănunțite și documentate a aspectului clinic și a procedeelor terapeutice în leucemia acută, preleucemie, leucemie cronică, sindrom DiGuglielmo.

Îmbolnăvirile recent definite ale sistemului limfatic sînt cuprinse în volumul următor al seriei amintite. Prezenta carte, tratată în colaborare cu opt coautori de specialitate, aflată la a cincea ediție îmbunătățită față de precedenta, este de mare folos atît în practica cît și în cercetarea clinică. Cartea se încheie cu un index tematic ce ajută orientarea mai rapidă prin material; fiecare capitol are la sfîrșit o bogată listă bibliografică.

Gabriela Angel

R. L. DOBRUSHIN, V. I. KRYUKOV și A. L. TOOM, *Lecture Notes in Mathematics*, no. 653, *Sisteme cu interacții locale și aplicațiile lor în biologie*, 202 pg., 23 fig., 2 tab., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978, 24,80 DM (l. engleză)

Fascicula prezentă, editată de R. L. Dobroushin, V. I. Kryukov și A. L. Toom cuprinde lucrările școlii de la Puschino, Moscova, din martie 1976, pe procese de interacție tip Markov în biologie. Toate cele 14 lucrări cuprinse în volum au fost concepute pe o bază matematică unică: teoria sistemelor cu un număr mare de componente cu interacții locale. Această variantă a teoriei sistemelor este un bun instrument pentru tratarea matematică a unor sisteme reale de natură diferită, ca sistemele biologice, chimice, fizice și chiar socio-economice. De fapt imposibilitatea de a rezolva problemele acestor sisteme în limitele matematicii clasice au dus la dezvoltarea unei noi ramuri a teoriei probabilităților: cîmpuri markoviene pentru tratarea proceselor în interacție și interdependență.

Prezenta culegere este bazată pe comunicările prezentate la școala de la Puschino, materialele fiind completate cu ultimele rezultate acumulate în domeniu. Lucrările au fost grupate de două secțiuni în baza conținutului lor. Prima secțiune include articole referitoare la sisteme a căror caracteristică specifică este de natură deterministă. Astfel, sînt luate în discuție probleme ale sistemelor cu evoluție monotonă în spații reale, sistem neergodic unidimensional cu interacții locale nedegenerate, rețele omogene, metode de studiu (algoritmi) pentru studiul mediilor ergodice și neergodice, sisteme deterministice monotone omogene și în fine, estimarea capacității informaționale a celulelor Purkinje.

Secțiunea a doua grupează lucrările cu caracter probabilistic mai evident ca reprezentarea Gibbs a cîmpului probabilistic, evoluția unui sistem cu distribuție Gibbs staționară, ireversibilă în timp, modelarea unor activități neuronale, sisteme multicomponente monotone, o teorie spectrală a proceselor markoviene în spațiul stărilor utilizate în teoria cuantică și în fine extinderea cîmpurilor discrete la cîmpuri continui printr-o interpretare nouă reprezentării Gibbs.

Parcurgerea volumului necesită cunoștințe de matematică modernă, sensul biologic fiind adesea neexplicitat; chiar editorii menționează că lucrarea este adresată unor matematicieni, biofizicieni, ingineri. Lucrarea poate servi drept bază de colaborare între biologi și matematicieni.

Gabriela Angel

J. E. VANDERPLANK, *Genetic and molecular basis of plant pathogenesis, Advanced Series in Agricultural Sciences 6*; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978, 167 p., 3 figs, $ 24.

În cele 10 capitole cartea oferă o informație recentă și bogată asupra suportului genetic și molecular al bolilor la plante. Aspectele incluse sînt discutate în lumina noilor orientări în biologie și biochimie, rolul proteinelor în patologia vegetală fiind deseori abordat în strînsă corelație cu zestrea genetică a organismelor.

În primele trei capitole autorul ne familiarizează cu ipotezele referitoare la sensibilitatea și rezistența plantelor, genele pentru avirulență, rolul temperaturii în infecții, modul de hrănire al patogenului etc. În continuare sînt prezentate date despre suprafețele antigenice

comune între gazdă și patogen, rolul glicoproteinelor din membrane în conferirea rezistenței față de patogen și a altor substanțe ca lectinele, fitoalexinele etc.

Un capitol aparte este afectat populațiilor genetice de patogeni, capitol în care sînt descrise genele de rezistență din gazdă care influențează durata rezistenței; se face distincție pe bază moleculară între rezistența verticală și cea orizontală, teorii privind frecvența alelelor pentru virulență și avirulență.

În ultima parte a cărții facem cunoștință cu rolul patotoxinelor în conturarea specificității gazdă-patogen, cu procesele biotrofice și necrotrofice implicate în parazitism, cu alte caracteristici ale interacțiunilor gazdă-parazit.

Bibliografia bogată și indexul de subiecte incluse ajută efectiv munca celui interesa ‹ în problematica cărții, a celui dornic să cunoască noile valențe ale luptei dintre gazde și paraziții vegetali.

Ioana Hagima

K. RICHTER, *Allgemeine Electrophysiologie* (*Electrofiziologie generală*), VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1979, 135 pag., 55 figuri, 9 tabele, 19 M D.D.R.

Electrofiziologia este unul din domeniile care, strins legat de progresele bioingineriei și tehnicii de calcul, a cunoscut o rapidă dezvoltare în ultimii ani. Cartea de față a fost concepută ca un manual postuniversitar fiind adresată celor ce doresc să se specializeze în electrofiziologie. Înglobînd în material și ultimele rezultate din domeniul cercetării electrofiziologice, cartea prezintă bazele teoretice și principalele tehnici de lucru de electrofiziologie. Lucrarea poate fi utilă și ca interes general, prezentînd bine proporționat, programatic, întreaga problematică a electrofiziologiei.

Capitolul 1 se ocupă de potențialele celulei vii ca obiect al electrofiziologiei : dezvoltarea istorică a înțelegerii bioelectricității, potențial de membrană de repaus, de acțiune, excitabilitate, potentiale extracelulare. În legătură cu potențialele extracelulare sînt tratate electromiografia, electrocardiografia, electrooculografia, electroneurografia, electroencefalografia, electroretinografia.

Capitolul 2 se ocupă de probleme tehnice legate de electrozi, microelectrozi, macroelectrozi, amplificare, telemetrie precum și de probleme ale prelucrării datelor experimentale (potențiale bioelectrice ca sursă de informație, analiza potențialelor unice, analiza fenomenelor electrice intracelulare, extracelulare, interpretarea EEG, EKG, EMG, potențial evocat).

Capitolul 3 tratează problemele teoretice și practice legate de posibilitățile de modificare și influențare a biopotențialelor, tehnici de excitare.

Remarcăm prezentarea clară, concisă a materialului însoțit de numeroase schițe, fotografii, grafice tabele. Cartea se încheie cu o listă bibliografică și un index tematic cu numeroase cuvinte cheie.

Gabriela Angel

M. ANKE, M. RISCH, *Haaranalyse und Spurelementstatus* (*Analiza părului și conținutul de microelemente*), VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1979, 267 pag, 38 fig., 204 tab., 27.50 M D.D.R.

Prezența elementelor anorganice în păr este o problemă ce a fost luată în studiu cu peste două decenii în urmă. În toți acești ani s-au adunat numeroase informații și date, unele excepționale, altele utilizabile în practica de fiecare zi astfel încît apariția unei cărți care sistematizează rezultatele din acest domeniu, este binevenită.

Indicații asupra elementelor ce se găsesc în cantități mari în organism (Ca, Mg, Na, K, P) se obțin cu mai mare precizie din analiza altor părți constituente ale organismului. Indicațiile asupra microelementelor sînt comparate în prezenta carte cu cele obținute din analiza altor 10 surse (părți ale organismului) reieșind fidelitatea bună a metodei de analiză a părului.

Cartea este împărțită în șase capitole dintre care primele două tratează anatomia și morfologia părului ; capitolele trei și patru se ocupă de componentele organice ale părului și elementele majoritare. Capitolul cinci, care se întinde pe aproape 200 de pagini din totalul de 26 ale cărții, tratează de fapt problema enunțată în titlu.

Elementele luate în discuție sînt mangan, cupru, zinc, seleniu, molibden, iod, cadmiu, plumb, mercur. Autorul folosește o schemă unitară de discuție atingînd problemele : date cantitative asupra prezenței microelementului respectiv în păr și alte organe ; influența felului și culorii părului, a sexului, vîrstei individului și vîrstei părului, graviditații, lactației asupra conținutului în elementul respectiv.

Materialul prezentat este însoțit de peste 200 de tabele și aproape 40 de scheme și grafice, lista bibliografică fiind de aproape 30 de pagini. Cartea de față poate sluji drept compendiu de referință pentru specialiști din numeroase domenii ca medicină umană și veterinară, farmacie, protecția mediului, gospodărirea apelor și alte ramuri ale biologiei, chimiei, geologiei.

Gabriala Angel

S. BLEECKEN, *Progrese în biofizica experimentală și teoretică*, vol. 23, *Dinamica populației microorganismelor unicelulare. Modelare și utilizare*, VEB Georg Thieme Leipzig, 1979, 112 pag., 40 fig., 3 tab., 28 M.D.D.R., (l. germană)

Teoria populațiilor microorganismelor caută să evidențieze dependențele fundamentale dintre caracteristicile unei populații, proprietățile individului și relațiile cu mediul ambiant. Cartea de față reprezintă o contribuție la studiul populațiilor de microorganisme unicelulare pro- și eucariote. Comportamentul acestor populații, în funcție de proprietățile organismului unicelular și într-o tratare mai dezvoltată, în funcție de parametrii mediului ambiant, este prezentat prin modele matematice și într-un formalism matematic adecvat.

În primele capitole se descrie baza biologică a proceselor modelate și se stabilesc termenii modelelor. Astfel, după o scurtă introducere și prezentare a conceptelor care stau la baza modelării, se descriu sistemele de reproducere ale celulelor eucariote, procariote, un model structural general al sistemelor de reproducere, interacția dintre metabolism și reproducere. Un capitol aparte este consacrat prezentării formalismului utilizat pentru descrierea structurii sistemului (populația studiată), stării sistemului, cineticii sistemului, relației sistem-componente ale sale, parametrilor funcționali ai sistemului.

Următoarele capitole prezintă tipurile de modele utilizate pentru descrierea a astfel de sisteme : 1) modele deterministice, utilizarea și limitele acestor modele, comparația cu datele experimentale ; 2) modele stocastice pentru condiții invariabile de mediu ; 3) modele stocastice pentru condiții variabile de mediu cu discuția semnificației mărimilor statistice în problemele reproducerii celulare și creșterii populației.

Lucrarea se adresează unor specialiști, parcurgerea ei necesitînd cunoștințe avansate de matematică. Remarcăm frumoasa prezentare grafică a lucrării. Cartea se încheie cu o bogată listă de indicații bibliografice.

Gabriela Angel

Iarc monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Polychlorinated biphenyls and polybrominated biphenyls (Monografiile IARC asupra evaluării riscului carcinogenic la om. Compușii policlor- și polibrom-bifenilici), International Agency for Research in Cancer, Volume 18, Lyon, 1978, US $ 13.00.

Volumul de față reprezintă punctul de vedere al celor două grupuri de experți IARC, întruniți la Lyon, la 10—15 octombrie 1977 și 6—13 iunie 1978.

Ca și în volumele anterioare, sînt expuse la început instrumentele de lucru, în sensul descrierii criteriilor și metodologiei în general, care au determinat alegerea unor substanțe pentru a fi indexate, precum și maniera de organizare și tratare a materialului la dispoziție. În speță este vorba de compuși cu largă aplicație industrială și cu stabilitate fizică și chimică remarcabile, în consecință, aceștia reprezintă factori importanți ai poluării mediului în țările industrializate, atît din cauza persistenței lor, cît și a unor accidente cauzate de erori (citate în volum). Diferite substanțe policlor- și polibrom-bifenilice intră în compoziția unor izolatori termici și electrici, lubrifianți, mase plastice, pesticide, lacuri și vopsele etc. Au fost detectate în aer, în sol și plante, în alimente (lapte, pește) etc. Aceste substanțe sînt toxice la mai multe nivele fiziologice și s-au descris, de asemenea, efecte teratogene.

După ce sînt menționate proprietățile fizico-chimice și analitice ale compușilor în discuție, sînt evidențiate datele biologice și de cancerogeneză experimentală. Este evaluat riscul carcinogenic la om, ținînd seama și de prezența unor substanțe, cu alte structuri, care se găsesc în produșii industriali ce conțin policlor- sau polibrom-bifenil.

Vl. Gheordunescu

Substrate mobilization and energy provision in man, Biochemical Society Symposium no 43, P. B. Garland, C. N. Hales (editors) London, The Biochemical Society, 1978, 228 p., U $ 32.00

Cel de-al patruzeci și treilea simpozion al Societății engleze de biochimie, desfășurat la Cardiff în 1977 a avut ca temă reglarea metabolică, cu un accent special pe controlul căilor majore de catabolism la om. Bineînțeles, cele mai multe din experiențe s-au realizat în sisteme animale, care însă s-au dovedit modele foarte utile în abordarea unor probleme de biochimie umană, normală și patologică.

Volumul de față cuprinde lucrările prezentate la acest simpozion de către specialiști din Anglia și S.U.A.

O serie din lucrări discută controlul metabolic al diferitelor procese biochimice, cum sînt proteoliza, metabolismul aminoacizilor, oxidarea piruvatului și conservarea glucozei, cetogeneza ; un articol foarte interesant este consacrat ciclurilor substratelor, cu implicațiile lor metabolice, energetice și termice la om.

Altă serie de lucrări discută controlul hormonal al unor metabolisme, cum sînt proteoliza, furnizarea de glucoză de către ficat, sinteza glicogenului, lipoliza țesutului adipos, metabolismul corpilor cetonici.

Multe din lucrările prezentate aduc o contribuție valoroasă la cercetarea clinică a diabetului, obezității, subalimentației, a aspectelor medicale ale acțiunii hormonilor.

Volumul, ce cuprinde și un index de autori și un index de subiecte, este o sursă de informații actuală și foarte utilă pentru cei interesați în reglarea și controlul metabolismului cu implicațiile lor clinice.

Constanța Mușolan

RECTIFICARE

În revista „Studii și cercetări de biochimie", vol. 22, nr. 1 (1979), la articolul „Rolul părții glucidice în degradarea intracelulară a proteinelor. VII. Proteoliza controlată cu papaină a IgM nativă și tratată cu un amestec glicozidazic din *Diplococus pneumoniae*" de Corina Mihail, Cecilia Motaș, Florina Mihalcu (p. 23—39), figura 7 se prezintă astfel:

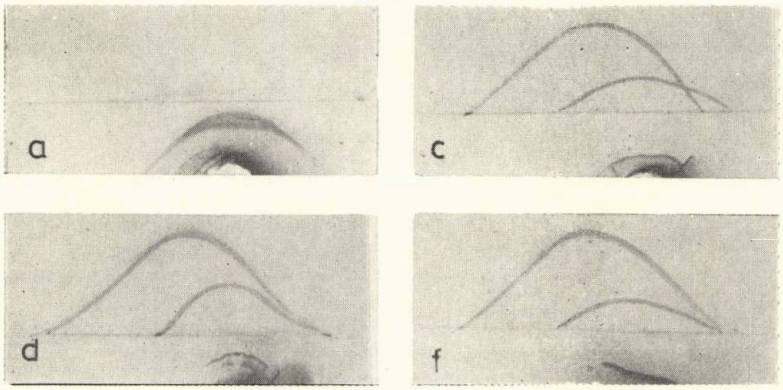


Fig. 7. — Imunoelectroforeza încrucișată a probelor supuse hidrolizei și acțiunii glicozidazelor.
a), c), d), f), aceleași indicații ca în fig. 4.

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale la nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : Viaţa ştiinţifică, în care prin note scurte sînt aduse la cunoştinţă cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc., recenzii, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilsutraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 30 de extrase, gratuit. Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii, etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : 78171 Bucureşti 2, P.O.B. 2–2

1980 JAN 4

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

V. I. DEACIUC, **Reglarea celulară a metabolismului glucozei şi acizilor graşi**, 1973, 255 p., 10,50 lei.

CRISTOFOR SIMIONESCU, VIORICA RUSAN şi VALENTIN POPA, **Chimia algelor marine**, 1974, 212 p., 18 lei.

D. A. ABRAHAM, **Mecanismul de acţiune al hormonilor steroizi**, 1975, 184 p., 13 lei.

EMIL POP şi RADU CODREANU, **Istoria ştiinţelor în România. Biologia**, 1975, 287 p., 13,50 lei.

ELENA GABRIELESCU, **Neuroprotezele**, 1978, 157 p., 22 lei,

P. G. PLOAIE şi ZOE PETRE, **Introducere în microscopia electronică cu aplicaţie la biologia celulară şi moleculară**, 1979, 330 p., 33 lei.

GH. ZAMFIR, **Efectele unor poluanţi şi prevenirea lor**, 1979, 176 p., 12,50 lei.

ST. PETERFI şi AL. IONESCU (sub redacţia), **Tratat de algologie**, vol. III, 1979, 375 p., 33 lei.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 22, NR. 2 p. 97–244 BUCUREŞTI, IULIE–DECEMBRIE, 1979.

I.P.Informaţia c. 1565

43 816

Lei 20. –